

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Análise morfológica e filogenética com descrição de novas espécies de microparasitos
de peixes naturais oriundos dos três principais rios da Bacia Hidrográfica do
Tietê/Jacaré do estado de São Paulo, Brasil

Débora Caroline Negrelli

Botucatu

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Análise morfológica e filogenética com descrição de novas espécies de microparasitos de peixes naturais oriundos dos três principais rios da Bacia Hidrográfica do Tietê/Jacaré do estado de São Paulo, Brasil

Débora Caroline Negrelli

Orientador: Prof. Dr. Rodney Kozlowiski de Azevedo

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Botucatu/SP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Zoologia).

Botucatu

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Negrelli, Débora Caroline.

Análise morfológica e filogenética com descrição de novas espécies de microparasitos de peixes naturais oriundos dos três principais rios da Bacia Hidrográfica do Tietê/Jacaré do estado de São Paulo, Brasil / Débora Caroline Negrelli.
- Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Rodney Kozlowiski de Azevedo
Capes: 20400004

1. Biologia molecular. 2. Filogenia. 3. Histologia.
4. Peixe. 5. Parasitos. 6. Apicomplexa. 7. Myxozoa.
8. Microsporidia.

Palavras-chave: Apicomplexa; Microsporidia; Myxozoa;
Parasito; Peixe.

*Dedico aos meus pais,
avós (in memoriam) e
ao meu noivo.*

“Em meio à dificuldade encontra-se a oportunidade”

(Albert Einstein)

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pela força, esperança e fé proporcionada em todos os momentos da minha vida.

Agradeço imensamente aos meus pais Neusa e José por serem meu alicerce, além de todo amor e incentivo nos meus estudos.

Agradeço ao meu noivo e grande amor, Ivan, por sempre apoiar minhas decisões, pelo carinho e companheirismo.

Agradeço aos meus sogros Eva e Alcides pela amizade e por todo apoio.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rodney Kozlowiski de Azevedo por todo conhecimento transmitido e incentivo à pesquisa.

Agradeço a Profa. Dra. Vanessa Doro Abdallah por todos os ensinamentos, pelo incentivo e por ter me apresentado à pesquisa lá no início da minha graduação.

Agradeço ao Prof. Tit. Reinaldo José da Silva por disponibilizar o Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres - LAPAS e por todo o suporte para desenvolver as etapas do meu projeto de Doutorado.

Agradeço aos membros da minha família que torcem para meu sucesso.

Agradeço aos meus pets pela companhia diária ajudando nos momentos difíceis e por proporcionar muita alegria.

Agradeço aos meus amigos de Bauru do antigo Laboratório de Ictioparasitologia do Centro Universitário Sagrado Coração, onde iniciei a pesquisa, por toda amizade, viagens e colaborações.

Agradeço aos meus amigos de Botucatu, do LAPAS/UNESP, pelo incentivo, ensinamentos e colaborações.

Assim como, agradeço a todos os colegas que estão presentes na minha vida e acompanharam essa jornada me incentivando.

Agradeço aos técnicos responsáveis pelo processamento das amostras na microscopia eletrônica de transmissão e histologia da UNESP, pois foram fundamentais para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a todos os professores que estiveram presente durante essa longa jornada acadêmica, por todos os conhecimentos transmitidos.

Agradeço à UNESP/Botucatu, ao Instituto de Biociências e a todos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) e ao Departamento de Parasitologia por todo o suporte durante o período de Doutorado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (nº do processo 88882.180523/2018-01) pelo financiamento e auxílio na pesquisa científica.

Sumário

1. Introdução	20
1.1. Importância parasitária e relação parasito-hospedeiro-ambiente	20
1.2. Microparasitos	22
1.2.1. Microsporidia (Balbiani, 1882)	22
1.2.2. Apicomplexa Levine, 1970.....	25
1.2.3. Myxozoa Grassé, 1970	28
1.3. Peixes hospedeiros.....	32
1.3.1. <i>Pimelodella</i> spp	33
1.3.2. <i>Serrasalmus</i> spp.....	33
1.3.3. <i>Astronotus ocellatus</i> (Agassiz, 1831)	34
1.3.4. <i>Rhamdia quelen</i> (Quoy e Gaimard, 1824).....	35
1.4. Características principais das áreas de estudo	36
2. Objetivos.....	40
2.1. Objetivo geral	40
2.2. Objetivos específicos.....	40
3. Material e métodos	41
3.1. Coleta e análise dos espécimes hospedeiros.....	42
4. Referências	43
5. Capítulo I. Coccidiose hepática causada por <i>Calyptospora</i> cf. <i>C. gonzaguensis</i> (Apicomplexa: Calyptosporidae) em <i>Serrasalmus maculatus</i> coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil	63
6. Capítulo II. Descrição taxonômica e filogenética de novas espécies dos gêneros <i>Henneguya</i> e <i>Myxobolus</i> (Cnidaria: Myxobolidae) parasitando peixes serrasalmídeos provenientes dos três principais rios da Bacia Hidrográfica Tietê-Jacaré, município de Ibitinga, Brasil.....	86
7. Capítulo III. <i>Myxobolus imparfinis</i> parasitando <i>Pimelodella avanhandavae</i> (Heptapteridae, Siluriformes), proveniente do rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil	128
8. Capítulo IV. Caracterização morfológica e filogenética de novas espécies de mixozoários (Myxobolidae, Cnidaria) parasitos de <i>Pimelodella gracilis</i> Valenciennes, 1835 (Heptapteridae: Siluriformes) coletados no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil	148

9. Capítulo V. Primeiro registro de <i>Ovipleistophora</i> cf. <i>O. ovariae</i> (Microsporidia) em peixe serrasalmídeo coletado no rio Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil	188
10. Considerações finais	202
11. Anexo	204

Resumo

Parasitas buscam recursos e energia em seus hospedeiros para sobrevivência e desenvolvimento parasitário. As espécies de parasitos podem causar doenças aos seus hospedeiros ou podem ser adaptadas às espécies hospedeiras por associações coevolutivas. Os microparasitos principalmente em relação aos grupos Apicomplexa, Microsporidia e Myxozoa possuem importância por infectarem animais vertebrados e invertebrados. Neste estudo, foram analisados peixes que possuem vasta importância econômica. Espécimes de *Astronotus ocellatus*, *Pimelodella avanhandavae*, *Pimelodella gracilis*, *Rhamdia quelen*, *Serrasalmus* sp. e *Serrasalmus maculatus* capturados nos rios Jacaré-Guaçu, Jacaré-Pepira e Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil foram analisados com objetivo de identificar os microparasitos presentes. Este estudo está dividido em cinco capítulos: Capítulo I corresponde a descrição do coccídeo parasito correspondente ao gênero *Calyptospora* (Apicomplexa) infectando o hospedeiro *S. maculatus* coletado no rio Jacaré-Guaçu. O capítulo II trata da descrição de quatro novas espécies de *Henneguya* (Myxozoa) e duas novas espécies de *Myxobolus* (Myxozoa) parasitando espécimes de *Serrasalmus* coletados nos rios Jacaré-Guaçu, Jacaré-Pepira e Tietê. O capítulo III relata *Myxobolus imparfinis* parasitando a terceira espécie hospedeira (*P. avanhandavae*) em uma terceira localidade geográfica (rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil). O capítulo IV expõe dados morfológicos e filogenéticos de novas espécies de mixozoários dos gêneros *Henneguya* e *Myxobolus* parasitando o hospedeiro *P. gracilis* coletado no rio Jacaré-Guaçu. O capítulo V relata uma espécie de microsporídio relacionada ao gênero *Ovipleistophora* (Microsporidia) parasitando o ovário de *S. maculatus* coletado no rio Tietê. Este estudo tem a importância em contribuir com as informações sobre a biodiversidade de microparasitos de peixes do estado de São Paulo a partir das descrições morfológicas, moleculares e/ou filogenéticas e registrar a ocorrência dos microparasitos em novos hospedeiros e novas localidades geográficas.

Palavras-chave: Apicomplexa, Microsporidia, Myxozoa, parasito, peixe, rio Jacaré-Guaçu, rio Jacaré-Pepira, rio Tietê.

Abstract

Parasites seek resources and energy from their hosts for parasite survival and development. Parasite species can cause disease to their hosts or can be adapted to the host species by coevolutionary associations. Microparasites mainly in relation to the groups Apicomplexa, Microsporidia, and Myxozoa are important for infecting vertebrate and invertebrate animals. In this study, fish that have vast economic importance were analyzed. Specimens of *Astronotus ocellatus*, *Pimelodella avanhandavae*, *Pimelodella gracilis*, *Rhamdia quelen*, *Serrasalmus* sp. and *Serrasalmus maculatus* caught in the Jacaré-Guaçu, Jacaré-Pepira and Tietê Rivers, municipality of Ibitinga, state of São Paulo, Brazil were analyzed with the objective of identifying the microparasites present. This study is divided into five chapters: Chapter I corresponds to the description of the parasitic coccidia corresponding to the genus *Calyptospora* (Apicomplexa) infecting the host *S. maculatus* collected from the Jacaré-Guaçu River. Chapter II describes four new species of *Henneguya* (Myxozoa) and two new species of *Myxobolus* (Myxozoa) parasitizing specimens of *Serrasalmus* collected in the Jacaré-Guaçu, Jacaré-Pepira and Tietê rivers. Chapter III reports on *Myxobolus imparfinis* parasitizing the third host species (*P. avanhandavae*) at a third geographic location (Jacaré-Guaçu River, municipality of Ibitinga, São Paulo state, Brazil). Chapter IV presents morphological and phylogenetic data of new species of myxozoans of the genera *Henneguya* and *Myxobolus* parasitizing the host *P. gracilis* collected in the Jacaré-Guaçu River. Chapter V reports a species of microsporidia related to the genus *Ovipleistophora* (Microsporidia) parasitizing the ovary of *S. maculatus* collected in the Tietê River. This study is important to contribute with the information on the biodiversity of fish microparasites in the state of São Paulo from morphological, molecular and/or phylogenetic and record the occurrence of the microparasites in new hosts and new geographic locations.

Keywords: Apicomplexa, fish, Jacaré-Guaçu River, Jacaré-Pepira River, Microsporidia, Myxozoa, parasite, Tietê River.

Lista de figuras

Introdução

Figura 1. Representação do esporo de microsporídio. Fonte: Adaptado de Franzen (2004)	23
Figura 2. Desenho esquemático geral do esporo de apicomplexo. Fonte: Adaptado de Ruppert et al. (2005).....	27
Figura 3. Características morfológicas dos mixoesporos dos gêneros <i>Myxobolus</i> e <i>Henneguya</i> . Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2018, 2020).....	30
Figura 4. Espécime de <i>Pimelodella gracilis</i> (Valenciennes, 1835). Fonte: Autoria própria.....	33
Figura 5. Espécime de <i>Serrasalmus maculatus</i> Kner, 1858. Fonte: Autoria própria.....	34
Figura 6. Espécime de <i>Astronotus ocellatus</i> (Agassiz, 1831). Fonte: Autoria própria.....	35
Figura 7. Espécime de <i>Rhamdia quelen</i> (Quoy e Gaimard, 1824). Fonte: Autoria própria	36
Figura 8. Representação das 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos pertencentes ao estado de São Paulo. Destaque em vermelho para a Bacia Hidrográfica Tietê/Jacaré. Fonte: Adaptado do mapa disponibilizado por Estado de São Paulo (2014)	37
Figura 9. Representação dos 34 municípios que fazem parte da Bacia Hidrográfica do Tietê/Jacaré. Em destaque vermelho a representação do município de Ibitinga e a indicação em azul de apenas os rios Tietê, Jacaré-Guaçu e Jacaré-Pepira. Fonte: Adaptado do mapa disponibilizado por SIGRH (2022).....	37
Figura 10. Representação das sub-bacias da UGRHI 13 - Tietê/Jacaré. Fonte: Adaptado de Attanasio (2014)	38
Capítulo I	
Figura 1. <i>Calyptospora</i> cf. <i>C. gonzaguensis</i> parasitando o tecido hepático de <i>Serrasalmus maculatus</i> Kner, 1858 proveniente do rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. A. Oocisto maduro (seta) de <i>Calyptospora</i> cf. <i>C. gonzaguensis</i> contendo quatro esporocistos. Em destaque, oocisto imaturo (*). B. Ilustração esquemática do oocisto maduro.....	70

Figura 2. Análise ultraestrutural de *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* encontrada parasitando o tecido hepático de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 proveniente do rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Corte longitudinal do esporocisto destacando a abertura anterior coberta pela membrana (m), espessamento posterior (ponta de seta), esporozoítos contraídos (*) com restos do corpo residual. **B.** Corte longitudinal do esporocisto mostrando esporópodes na extremidade posterior (*), parede do oocisto (setas duplas), membrana ao redor dos esporocistos (m), esporocisto sem sutura e presença de papilas, região onde a sutura é fundida (seta). Destaque do esporocisto com abertura apical. Barra de escala: 2 µm74

Figura 3. Imagem macroscópica do tecido hepático de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 coletado do rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil mostra vários plasmódios (setas) contendo *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis*75

Figura 4. Imagem histológica do tecido hepático do *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil parasitado com *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis*. **A.** Agregados de oocistos de *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* (*) rodeados por tecido conjuntivo (seta) e infiltrados inflamatórios (seta aberta). **B.** Necrose do tecido hepático com dilatação sinusoidal (setas). **A-B.** Coloração de hematoxilina-eosina75

Figura 5. Imagem histológica do tecido hepático do *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil intensamente parasitado com *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis*. **A.** Nódulos fibróticos (seta) juntos com infiltrados inflamatórios (seta aberta). **B.** Fibrose (seta) e formação de granuloma (*). **C.** Centros melanomacrofágicos (seta) ao redor dos oocistos. **D.** Proliferação ductal (seta). **A-D.** Coloração de hematoxilina-eosina76

Figura 6. Árvore filogenética obtida pela análise por inferência Bayesiana com as sequências ssrDNA de parasitos coccídeos, *Adelina grylli* Butaeva, 1996 foi usada como outgroup. Os valores dos nós são representados pelo suporte de probabilidade posterior/bootstrap. Os valores abaixo de 0.60 e 60 são indicados por traços (-). Os números de acesso GenBank são mostrados antes do nome de cada espécie78

Capítulo II

Figura 1. Fotomicrografia dos mixoesporos maduros e plasmódio de *Henneguya* n. sp. 1 parasitando o estômago de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 coletado no rio Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A-B.** Vista frontal e lateral, respectivamente dos mixoesporos de *Henneguya* n. sp. 1. Destaque: túbulo polar com 10-

12 voltas. Barra de escala: 10 μ m. C. Plasmódio (seta) contendo mixoesporos de <i>Henneguya</i> n. sp. 1 localizado no estômago de <i>S. maculatus</i>	94
Figura 2. Fotomicrografia do mixoesporo maduro e plasmódios de <i>Henneguya</i> n. sp. 2 parasitando as brânquias de <i>Serrasalmus maculatus</i> Kner, 1858 coletado do rio Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. A. Vista frontal do mixoesporo de <i>Henneguya</i> n. sp. 2. B. Plasmódios (setas) contendo mixoesporos de <i>Henneguya</i> n. sp. 2 localizados nas lamelas branquiais de <i>S. maculatus</i>	96
Figura 3. Fotomicrografia dos mixoesporos maduros e plasmódio de <i>Henneguya</i> n. sp. 3. parasitando as brânquias de <i>Serrasalmus maculatus</i> Kner, 1858 coletado no rio Jacaré-Pepira, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. A. Vista frontal do mixoesporo de <i>Henneguya</i> n. sp. 3. Destaque: mixoesporo em vista lateral. Barra de escala: 10 μ m. B. Plasmódio contendo <i>Henneguya</i> n. sp. 3 (seta) na lamela branquial de <i>S. maculatus</i>	97
Figura 4. Vista frontal do mixoesporo de <i>Henneguya</i> n. sp. 4 coletado das lamelas branquiais de <i>Serrasalmus</i> sp. proveniente do rio Jacaré-Pepira, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. Destaque: mixoesporo com única cápsula polar. Barra de escala: 5 μ m.....	99
Figura 5. Fotomicrografia dos mixoesporos maduros de <i>Myxobolus</i> n. sp. 1 encontrado parasitando o rim de <i>Serrasalmus maculatus</i> Kner, 1858 coletado no rio Jacaré-Pepira, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. A-B. Vista frontal e lateral, respectivamente dos mixoesporos de <i>Myxobolus</i> n. sp. 1. Destaque: mixoesporo em vista apical. Barra de escala: 5 μ m.....	100
Figura 6. Fotomicrografia dos mixoesporos maduros de <i>Myxobolus</i> n. sp. 1 encontrado parasitando o coração de <i>Serrasalmus maculatus</i> Kner, 1858 coletado no rio Jacaré-Pepira, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil.....	101
Figura 7. Vista frontal do mixoesporo de <i>Myxobolus</i> n. sp. 2 que estava parasitando o rim de <i>Serrasalmus maculatus</i> Kner, 1858 coletado no rio Jacaré-Pepira, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil	102
Figura 8. Árvore filogenética gerada pela análise de inferência Bayesiana baseada nas sequências parciais de ssrDNA de espécies de mixozoários dos gêneros <i>Henneguya</i> e <i>Myxobolus</i> com <i>Henneguya</i> n. sp. 1, <i>Henneguya</i> n. sp. 2, <i>Henneguya</i> n. sp. 3 e <i>Myxobolus</i> n. sp. 1. Os números dos nós representam os valores de suporte e estão indicados por probabilidade posterior (BI)/bootstrap (ML). Valores menores que 0.60/60 estão representados por traços (-)	106

Capítulo III

Figura 1. Fotomicrografia de mixoesporos maduros de *Myxobolus imparfinis* Vieira, Tagliavini, Abdallah e Azevedo, 2018 parasitando filamento branquial de *P. avanhandavae* Eigenmann, 1917 coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Mixoesporo em vista frontal. **B.** Mixoesporo com túbulo polar visível, contendo de 6-7 voltas133

Figura 2. Fotomicrografias das secções histológicas das brânquias de *P. avanhandavae* Eigenmann, 1917 coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil com plasmódios contendo mixoesporos de *Myxobolus imparfinis* Vieira, Tagliavini, Abdallah e Azevedo, 2018. **A.** Plasmódio (seta) contendo mixoesporos de *M. imparfinis* no início da artéria branquial aferente do filamento branquial. **B.** Plasmódio (seta) no filamento branquial (seta aberta). Coloração: hematoxilina-eosina135

Capítulo IV

Figura 1. Fotomicrografia de mixoesporos maduros de *Myxobolus* n. sp. 3 parasitando a musculatura do arco branquial do hospedeiro *Pimelodella gracilis* Valenciennes, 1835 coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Mixoesporo em vista frontal (seta), em vista lateral (ponta de seta) e apical (duas setas) de *Myxobolus* n. sp. 3. **B.** Mixoesporo de *Myxobolus* n. sp. 3 em vista frontal com a presença de apêndice caudal. Observe o túbulo polar com 8-9 voltas dentro das cápsulas polares.....155

Figura 2. Fotomicrografia de mixoesporos maduros de *Myxobolus* n. sp. 4 parasitando *Pimelodella gracilis* Valenciennes, 1835 coletados no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Mixoesporo de *Myxobolus* n. sp. 4 em vista frontal coletado da nadadeira caudal. **B.** Mixoesporo de *Myxobolus* n. sp. 4 em vista frontal coletado do barbilhão com o túbulo polar direito extrudado. **C.** Mixoesporos de *Myxobolus* n. sp. 4 coletados da nadadeira peitoral com presença de apêndices caudais (setas).....156

Figura 3. Fotomicrografia de mixoesporos maduros de *Myxobolus* n. sp. 5 que estavam parasitando o arco branquial de *Pimelodella gracilis* Valenciennes, 1835 coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. Observe o túbulo polar contendo 7-8 voltas.....158

Figura 4. Fotomicrografia de mixoesporos maduro de *Henneguya* n. sp. 5 parasitando lamelas branquiais de *Pimelodella gracilis* Valenciennes, 1835 coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Mixoesporo em vista frontal

de *Henneguya* n. sp. 5. **B.** Mixoesporo em vista lateral de *Henneguya* n. sp. 5. Destaque: cápsulas polares com túbulos polares contendo 3-4 voltas. Barra de escala: 5 µm.....159

Figura 5. Árvore filogenética gerada pela análise de inferência Bayesiana (IB) baseada em sequências parciais ssrDNA de mixozoários dos gêneros *Myxobolus/Henneguya/Thelehanellus* com sequências parciais das novas espécies de *Myxobolus*. Os números de acesso ao GenBank são dados após o nome das espécies. Os números dos nós representam probabilidades posteriores da inferência Bayesiana (IB)/bootstrap de maximum likelihood (ML), respectivamente. Valores de suporte menores que 0.60/60 são representados por traços (-).....162

Capítulo V

Figura 1. Fotomicrografia do plasmódio e esporos de *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* coletado do ovário de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 oriundo do rio Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Plasmódio coletado do ovário. **B.** Esporos de *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae*, no qual a seta preenchida está indicando o vacúolo posterior e a seta aberta está indicando algumas voltas do tubo polar. Em destaque observamos o disco de ancoragem (seta fina). Barra de escala: 10 µm193

Figura 2. Análise ultraestrutural dos esporos maduros de *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* coletado do ovário de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 proveniente do rio Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Ultraestrutura dos esporos maduros isolados (setas pretas) e agrupados (setas brancas) dentro de vacúolos parasitóforos (*) em diferentes visões. **B.** Esporo com as principais características: disco de ancoragem (Da), polaroplasto (Pp), núcleo (N), vacúolo posterior (Vp) e tubo polar (Tp). **C.** Seção ultrafina da região anterior do espora mostrando o disco de ancoragem (Da), polaroplasto (Pp) e a parede constituída por exosporo (Ex) e endosporo (En). **D.** Seção ultrafina da região posterior do espora indicando o vacúolo posterior (Vp) e tubo polar (Tp). **E.** Seção ultrafina da região posterior mostrando os tubos polares (Tp).....195

Lista de tabelas

Material e métodos

Tabela 1. Relação da quantidade de espécimes de peixes coletados nos rios Jacaré-Pepira, Jacaré-Guaçu e Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. Ausência de hospedeiros coletados (X). O período de coleta dos hospedeiros encontra-se entre parênteses.....41

Capítulo I

Tabela 1. Dados morfométricos de oocistos e esporocistos de *Calyptospora* spp. coletadas em peixes do Brasil e Estados Unidos das Américas (EUA). Oocisto (O), comprimento do esporocisto (CE), largura do esporocisto (LE), extensão posterior (EP), Informação ausente (-). Os valores estão representados em micrômetros (μm) e estão expressados por média \pm desvio padrão. O intervalo dos valores mínimo e máximo estão entre parênteses.....71

Capítulo II

Tabela 1. Primers forward e reverse usados para amplificação de ssrDNA das novas espécies de *Henneguya* e *Myxobolus*. Combinação de primers: ERIB 1 - ACT1r, Myxgen4F - ERIB10 e MX3, MB5 - MX3, MC5 - MB3, MyxospecF - MyxospecR.....90

Tabela 2. Quantidade de espécimes de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 e *Serrasalmus* sp. analisados e parasitados correspondente aos rios Jacaré-Guaçu, Jacaré-Pepira e Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil e as respectivas espécies de parasitos e órgãos parasitados.....93

Tabela 3. Matriz de distância genética das sequências ssrDNA de *Henneguya* n. sp. 1, *Henneguya* n. sp. 2, *Henneguya* n. sp. 3 e *Myxobolus* n. sp. 1 com algumas espécies de mixozoários que parasitam espécies de peixes da ordem Characiformes da América do Sul. Valores no canto superior direito representam a porcentagem de similaridade de nucleotídeos e valores direcionados ao canto inferior esquerdo indicam o número de nucleotídeos diferentes. Os códigos após o nome das espécies correspondem ao acesso no GenBank104

Tabela 4. Comparação das características morfométricas dos mixoesporos, hospedeiros e órgãos infectados de *Henneguya* n. sp. 1, *Henneguya* n. sp. 2, *Henneguya* n. sp. 3 e *Henneguya* n. sp. 4 com algumas espécies de *Henneguya* pertencentes a espécies de peixes da ordem Characiformes presentes na América do Sul. Comprimento total do

mioxesporo (CTM), comprimento do corpo do mioxesporo (CM), largura do corpo do mioxesporo (LM), espessura do corpo do mioxesporo (EM), comprimento dos apêndices caudais (CAC), comprimento das cápsulas polares (CCP), largura das cápsulas polares (LCP), ^a=cápsulas polares maiores, ^b=cápsulas polares menores, número de voltas do túbulo polar (TP), órgãos infectados (OI), informação ausente (-). As medidas estão representadas em micrometro (µm) e estão expressadas por média ± desvio padrão. O intervalo dos valores mínimo e máximo estão entre parênteses.....111

Tabela 5. Comparação das características morfométricas dos mioxesporos, hospedeiros e órgãos infectados de *Myxobolus* n. sp. 1 e *Myxobolus* n. sp. 2 com algumas espécies de *Myxobolus* pertencentes a espécies de peixes da ordem Characiformes da América do Sul. Comprimento do corpo do mioxesporo (CM), largura do corpo do mioxesporo (LM), espessura do corpo do mioxesporo (EM), comprimento das cápsulas polares (CCP), largura das cápsulas polares (LCP), número de voltas do túbulo polar (TP), órgãos infectados (OI), informação ausente (-). As medidas estão representadas em micrometro (µm) e estão expressadas por média ± desvio padrão. O intervalo dos valores mínimo e máximo estão entre parênteses.....114

Capítulo III

Tabela 1. Primers usados na amplificação e sequenciamento da ssrDNA do mixozoário. Combinação de primers: ERIB1 - ACT1r, MB5 - MX3, Myxgen4F - MX3.....132

Tabela 2. Matriz de distância genética das sequências ssrDNA de *Myxobolus* spp. Dados acima representam a porcentagem de semelhança genética e dados abaixo representam a quantidade de nucleotídeos diferentes.....136

Tabela 3. Características morfométricas dos mioxesporos de espécies pertencentes ao gênero *Myxobolus* parasitando espécies de peixes correspondentes à família Heptapteridae e ordem Siluriformes na América do Sul. Comprimento do mioxesporo (CM), largura do mioxesporo (LM), espessura do mioxesporo (EM), comprimento das cápsulas polares (CCP), largura das cápsulas polares (LCP), ^a= representam as medidas das cápsulas polares maiores, ^b= representam as medidas das cápsulas polares menores, número de voltas do túbulo polar (TP), órgãos infectados (OI), informação ausente (-). Os valores estão representados em micrômetros (µm) e estão expressados por média ± desvio padrão. O intervalo dos valores mínimo e máximo estão entre parênteses137

Capítulo IV

Tabela 1. Características morfométricas dos mioxesporos de algumas espécies do gênero *Myxobolus* que parasitam espécies de peixes pertencentes as ordens Siluriformes e

Characiformes da América do Sul. Comprimento do corpo do mixoesporo (CM), largura do corpo do mixoesporo (LM), espessura do corpo do mixoesporo (EM), comprimento da cápsula polar (CCP), largura da cápsula polar (LCP), ^a= cápsulas polares maiores, ^b=cápsulas polares menores, número de voltas do túbulo polar (TP), órgãos infectados (OI), informação ausente (-). Os valores estão representados em micrômetros (µm) e estão expressados por média ± desvio padrão. O intervalo dos valores mínimo e máximo estão entre parênteses.....165

Tabela 2. Características morfométricas dos mixoesporos de *Henneguya* spp. que parasitam espécies de peixes da família Heptapteridae e ordem Siluriformes da América do Sul. Comprimento total do mixoesporo (CTM), comprimento do corpo do mixoesporo (CM), largura do corpo do mixoesporo (LM), espessura do corpo do mixoesporo (EM), comprimento do apêndice caudal (CAC), comprimento da cápsula polar (CCP), largura da cápsula polar (LCP), ^a= cápsulas polares maiores, ^b=cápsulas polares menores, número de voltas do túbulo polar (TP), órgãos infectados (OI), informação ausente (-). Os valores estão representados em micrômetros (µm) e estão expressados por média ± desvio padrão. O intervalo dos valores mínimo e máximo estão entre parênteses.....170

Capítulo V

Tabela 1. Comparação das características morfométricas dos esporos das espécies de microsporídios do gênero *Ovipleistophora* que parasitam as gônadas de peixes. Comprimento do esporo (CE), largura do esporo (LE), ^a= microesporos, ^b= macroesporos, localidade geográfica (LG), informação ausente (-). Os valores estão representados em micrômetros (µm) e estão expressados por média ± desvio padrão. O intervalo dos valores mínimo e máximo estão entre parênteses192

Lista de abreviações

AIC	Akaike Information Criterion
APA	Área de Proteção Ambiental
BHTJ	Bacia Hidrográfica Tietê/Jacaré
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CME	Centro de Microscopia Eletrônica
DIC	Diferencial Interference Contrast
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EUA	Estados Unidos das Américas
IB	Inferência Bayesiana
IBB	Instituto de Biociências de Botucatu
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
LAPAS	Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
ML	Maximum Likelihood
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
SIGRH	Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
ssrDNA	Small subunit ribosomal DNA
UGRHI	Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UV	Ultraviolet

1. Introdução

1.1. Importância parasitária e relação parasito-hospedeiro-ambiente

Há vasta diversidade de parasitos e estes são conhecidos por explorarem e infectarem seus hospedeiros sejam de ambientes terrestres ou aquáticos marinhos/dulcícolas em busca de recursos e energia para sobrevivência, ou seja, para o crescimento e desenvolvimento parasitário (Barber, 2005; Morand, 2015; Sánchez et al., 2018). Mas o quão prejudicial os parasitos vão ser aos hospedeiros irá depender da espécie, do tempo de exposição ao parasito, da quantidade de parasitos, dos recursos disponíveis, da qualidade ambiental e do modo de agir do hospedeiro (Hart, 1990; Barber e Dingemans, 2010).

Os parasitos podem beneficiar-se dos seus hospedeiros, causando vulnerabilidade para novas doenças, esgotamento de recursos e energia, mudanças comportamentais, estresse e danos em órgãos e tecidos, podendo também provocar a morte devido à elevada infecção (Anderson e May, 1982; Hart, 1990; Arnott et al., 2000; Moore, 2002; Sánchez et al., 2018).

Espécies de parasitos podem ser adaptadas à espécie hospedeira por associações coevolutivas, nas quais envolvem a exploração, infecção e virulência do parasito e suscetibilidade, mortalidade ou resistência do hospedeiro (Morand, 2015; Ezenwa et al., 2016). Portanto, parasitos de ambientes naturais tem capacidade de criar diversas funções e adaptam-se para completar o ciclo de vida no tempo ideal (Poulin, 1994; Luque, 2004). Tais adaptações são alta fecundidade, escolha do órgão ou tecido do hospedeiro e mudanças no comportamento do hospedeiro para auxiliarem na conclusão da vida parasitária e sucesso da transmissão do parasito (Poulin, 1994, 2010; Barber e Dingemans, 2010; Lafferty e Shaw, 2013; Ezenwa et al., 2016). Como exemplo, as mudanças comportamentais ou morfológicas geradas pelos parasitos em seus hospedeiros, podem tornar os hospedeiros intermediários mais suscetíveis a predação pelos hospedeiros definitivos, com o objetivo de completar o ciclo de vida (Lafferty e Shaw, 2013). Desta forma, quando o parasito gera a mudança no hospedeiro, esta não é vista em relação ao nível de alterações provocadas, mas o quanto a mudança no hospedeiro foi significativa para ter o sucesso da transmissão do parasito (Poulin, 1994, 2010).

Além das situações relacionadas às associações parasito-hospedeiro relatadas anteriormente, pode ocorrer tolerância do hospedeiro ao parasitismo, que é quando os hospedeiros conseguem conviver com as altas taxas de infecção parasitária, sem afetar a qualidade de vida (Sánchez et al., 2018). Essa situação pode acontecer pois os animais de vida selvagem são expostos constantemente aos parasitos e patógenos, nos quais desenvolvem sistemas de defesas comportamentais e/ou imunológicas e estratégias que detectam, evitam, controlam e/ou eliminam a infecção a fim de preservar a reprodução e sobrevivência (Hart, 1990; Moore, 2002; Barber e Dingemanse, 2010; Behringer et al., 2018; Buck et al., 2018; Hawley et al., 2021).

Anderson e May (1982) concluíram que para ter equilíbrio na relação hospedeiro-parasito depende da transmissão bem sucedida do parasito e sucesso reprodutivo do hospedeiro. Para a sobrevivência do parasito depende da virulência e transmissão, como exemplo, pode haver virulência reduzida quando os parasitos não são transmitidos a novos hospedeiros, e, conseqüentemente, maiores chances de sobrevivência dos parasitos, pelo fato dos hospedeiros seguirem reproduzindo e desenvolvendo mesmo com a infecção. Enquanto que se houver maior virulência, a transmissão e sobrevivência do parasito será reduzida, pois a sobrevivência de um parasito está relacionada com o tempo que ele consegue sobreviver dentro do hospedeiro, isto é, se ocorrer a morte do hospedeiro, o parasito será eliminado (Frank, 1996; Barber e Dingemanse, 2010).

Quanto a suscetibilidade dos parasitos-hospedeiros às alterações ambientais, o aumento do parasitismo em ambientes poluídos está relacionado aos estressores ambientais que podem alterar a imunidade dos hospedeiros tornando-os mais suscetíveis aos parasitos (Lafferty e Kuris, 1999; Behringer et al., 2018). Além disso, alterações na temperatura do ambiente podem aumentar a transmissão dos parasitos, ou interferir no crescimento e desenvolvimento dos mesmos (Wharton, 1999).

Em relação aos parasitos de peixes, sabemos que podem influenciar na comercialização dos peixes, devido a sua presença ou cistos visíveis (Lafferty e Kuris, 1999). Além disso, os efeitos dos parasitos causados nos hospedeiros podem ser visualizados principalmente em situações que há morte em massa dos animais, ou através de fatores corporais, verificando o estado nutricional do hospedeiro. Todavia, se torna difícil estimar o motivo da mortalidade quando há reduções dos espécimes e não há provas de infecção parasitária (Sindermann, 1987; Sánchez et al., 2018).

Os parasitos pertencentes aos grupos de protozoários coccídeos, microsporídios e mixozoários podem acometer os peixes e dependendo da espécie do parasito pode causar

mortalidade ou dependendo do tipo de infecção podem gerar perda das funções dos órgãos, redução do crescimento, perda nutricional e/ou castração dos hospedeiros (Sindermann, 1987; Ducatez et al., 2020).

1.2. Microparasitos

Os microparasitos são compostos principalmente por vírus, bactérias, protozoários, fungos e mixozoários (May e Anderson, 1979; Anderson e May, 1982). A seguir, será apresentado algumas características dos microparasitos pertencentes aos grupos Microsporidia, Apicomplexa e Myxozoa.

Há recentes trabalhos referentes à descrição de novas espécies de microparasitos de peixes realizados na América do Sul, porém ainda existem muitas espécies desconhecidas. Portanto, os estudos realizados com esses grupos de parasitos são fundamentais para que se conheça a biodiversidade oculta.

1.2.1. Microsporidia (Balbiani, 1882)

Microsporídios são organismos eucarióticos unicelulares e parasitos obrigatórios intracelulares e intracitoplasmáticos que infectam uma grande diversidade de hospedeiros, entre eles estão os protistas unicelulares, invertebrados e vertebrados, incluindo os humanos (Weiss e Vossbrinck, 1998; Vávra e Lukeš, 2013; Stentiford et al., 2016). Os registros de microsporídios em humanos foram a partir de infecções com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), por infecções zoonótica e pela água (Garcia, 2002; Xu e Weiss, 2005). Esses organismos são considerados parasitos específicos de seus hospedeiros e tecidos (Vávra e Lukeš, 2013).

Há em torno de 220 gêneros compostos por parasitos microsporídios e cerca de 1300 espécies descritas (Lom e Nilsen, 2003; Franzen, 2008; Vávra e Lukeš, 2013; Cali e Becnel, 2017; Park e Poulin, 2021). Já em relação aos microsporídios parasitos de peixes, há aproximadamente 20 gêneros com cerca 160 espécies conhecidas (Lom e Nilsen, 2003; Stentiford et al., 2013).

A primeira identificação de microsporídio foi em 1857 por Nägeli, no qual *Nosema bombicis* Nägeli, 1857 foi descrito no bicho-da-seda (Nägeli, 1857). Porém, Gluge em 1838 já havia relatado microsporídio em peixe, sendo que mais tarde foi nomeado como *Glugea anomala* (Moniez, 1887) (Gluge, 1838; Moniez, 1887).

A princípio, os microsporídios foram descritos como leveduras e bactérias, depois como protozoários parasitos e também já foram caracterizados como eucarióticos mais primitivos pela ausência de mitocôndrias (Keeling e Fast, 2002; Keelling, 2009; Vávra e Lukeš, 2013). Por meio dos estudos dos caracteres morfológicos, das análises moleculares do gene “small subunit ribosomal DNA” - ssrDNA e dos genomas, identificaram que esses organismos não possuem flagelos, formam esporos, possuem quitina na parede dos esporos e possuem genoma menor, portanto, tais características determinam que os microsporídios estão intimamente relacionados aos fungos (Weiss et al., 1999; Katinka et al., 2001; Vossbrinck e Debrunner-Vossbrinck, 2005; Gill e Fast, 2006; Lee et al., 2008; Capella-Gutiérrez et al., 2012; Han e Weiss, 2017).

A principal forma de identificação dos microsporídios é pela característica morfológica do esporo (Sprague et al., 1992), mas para obter um diagnóstico eficaz de identificação desses microparasitos é necessário usar outras análises em conjunto com a morfologia, como as informações ultraestruturais, moleculares e/ou filogenéticas (Weiss e Vossbrinck, 1998; Garcia 2002).

Os esporos de microsporídios variam de tamanho (1 a 20 μm), são compostos por uma parede com três camadas: exosporo, endosporo e membrana plasmática, e, na parte interna do esporo contém esporoplasma, polaroplasto, vacúolo posterior e aparelho de extrusão, este último consiste em tubo polar e disco de ancoragem (**Figura 1**), além do mais, outras partes do esporo são compostos por ribossomo, núcleo e citoplasma (Franzen e Müller, 1999; Bigliardi e Sacchi, 2001; Franzen, 2005; Xu e Weiss, 2005; Phelps e Goodwin, 2008).

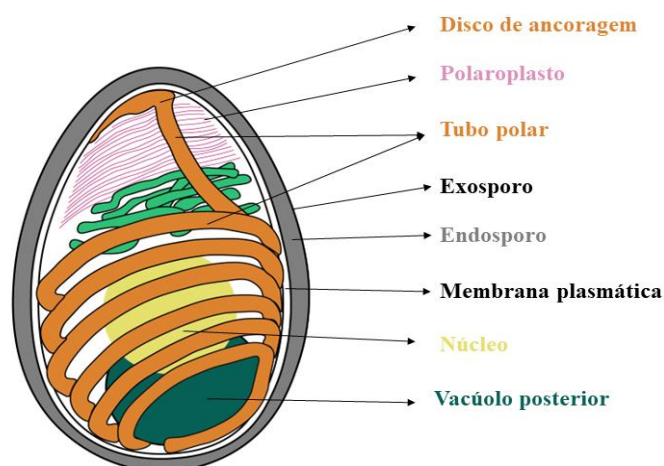


Figura 1. Representação do esporo de microsporídio. Fonte: Adaptado de Franzen (2004).

O polaroplasto, tubo polar e vacúolo posterior são os responsáveis por iniciar a infecção no hospedeiro alvo (Keeling e Fast, 2002). O que diferencia principalmente a estrutura dos esporos entre as espécies de microsporídios são principalmente o tamanho dos esporos e o número de voltas do tubo polar (Keeling e Fast, 2002; Lom e Nilsen, 2003).

O ciclo de vida corresponde em esporos maduros de microsporídios que são liberados pela urina, fezes ou a partir da decomposição dos seus hospedeiros e, após são eliminados no ambiente (Franzen, 2005). Os esporos que são ingeridos ou inalados germinam e assim que já estão dentro do hospedeiro, o tubo polar do esporo é estendido e insere o esporoplasma (agente infeccioso) no citoplasma da célula do hospedeiro ou eventualmente no núcleo da célula, onde conseqüentemente inicia-se os estágios de infecção (Keeling e Fast, 2002; Lom e Nilsen, 2003; Vávra e Lukeš, 2013). No estágio proliferativo, ocorre a merogonia, onde o esporoplasma injetado desenvolve-se em merontes e no estágio de esporogonia (produção de esporos) desenvolvem-se em esporontes e dividem-se em esporoblastos que se desenvolvem em esporos maduros e são liberados do hospedeiro para o meio ambiente e reiniciam o ciclo (Vossbrinck e Debrunner-Vossbrinck, 2005; Xu e Weiss, 2005).

Além da infecção ser por esporos presentes no meio ambiente (transmissão horizontal), pode acontecer por meio dos esporoplasmas que são injetados nas células das gônadas do hospedeiro parental (transmissão vertical) (Franzen, 2004; Vávra e Lukeš, 2013). Há outros estudos que mostram que os microsporídios podem infectar as células hospedeiras por fagocitose (Bigliardi e Sacchi, 2001; Franzen, 2004; 2005).

Os gêneros mais comuns dentro do grupo de microsporídios parasitos de peixes são *Nosema* Nägeli, 1857, *Microsporidium* Balbiani, 1884, *Glugea* Thélohan, 1891, *Pleistophora* Gurley, 1893, *Ichthyosporidium* Caullery e Mesnil, 1905, *Heterosporis* Schubert, 1969, *Nosemoides* Vinckier, 1975, *Spraguea* Sprague e Vávra, 1976, *Tetramicra* Matthews e Matthews, 1980, *Loma* Morrison e Sprague, 1981, *Microgemma* Ralphs e Matthews, 1986, *Microfilum* Faye, Toguebaye e Bouix, 1991, *Nucleospora* Hedrick, Groff e Baxa, 1991, *Neonosemoides* Faye, Toguebaye e Bouix, 1996, *Kabatana* Lom, Dyková e Tonguthai, 1999, *Pseudoloma* Matthews, Brown, Larison, Bishop-Stewart e Kent, 2001, *Ovipleistophora* Pekkarinen, Lom e Nilsen, 2002, *Amazonospora* Azevedo e Matos, 2003, *Potaspora* Casal, Matos, Teles-Grilo e Azevedo, 2008 e *Paranucleospora* Nylund, Nylund, Watanabe, Arnesen e Karlsbakk, 2010 (Lom, 2002; Lom e Nilsen, 2003; Lom e Dyková, 2005; Casal et al., 2016).

Os microsporídios quando infectam os peixes podem ou não produzir xenomas (Shaw e Kent, 1999; Kent et al., 2014). Xenoma refere-se à célula do hospedeiro alterada pela proliferação dos esporos, no entanto, essa estrutura pode proteger o hospedeiro evitando que os microsporídios se proliferem nas células ao redor, mas por outro lado, pode causar morte celular e hipertrofia da célula do hospedeiro (Lom e Nilsen, 2003; Lom e Dyková, 2005). O xenoma também tem função de proteger o parasito contra o sistema imunológico do hospedeiro (Sitjà-Bobadilla, 2008). Como característica, os xenomas são vistos macroscopicamente como cistos com coloração branca e as células infectadas podem medir aproximadamente 500 µm (Kent et al., 2014).

Os microsporídios de peixes são amplamente distribuídos e podem causar doenças graves em seus hospedeiros (Abdel-Ghaffar et al., 2011). Alguns hospedeiros podem ter redução do crescimento, problemas na natação, problemas reprodutivos, alterações funcionais dos órgãos e inflamação dos tecidos (Shaw e Kent, 1999; Phelps et al., 2015). Como exemplo, há a espécie *Nucleospora braziliensis* Rodrigues, Francisco, David, da Silva e Araújo Júnior, 2017 que causa inflamações nos tecidos dos espécimes de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Rodrigues et al., 2017). Portanto, conforme as lesões geradas pelas espécies de microsporídios, os hospedeiros podem se tornar mais suscetíveis ao estresse e conseqüentemente morrerem, causando perdas econômicas significativas (Sindermann, 1987; Shaw et al., 2000; Rodrigues et al., 2017).

1.2.2. Apicomplexa Levine, 1970

Os parasitos apicomplexos geralmente são parasitos obrigatórios intracelulares e acometem uma variedade de invertebrados e vertebrados, sendo que nos humanos, são responsáveis por transmitirem a malária, toxoplasmose e criptosporidiose (Levine, 1988a; Arisue e Hashimoto, 2015). Há em torno de 300 gêneros e aproximadamente 6000 espécies descritas de apicomplexos (Levine, 1894; Morrison, 2008, 2009; Votýpka et al., 2016; Xavier et al., 2018).

Espécies pertencentes ao filo Apicomplexa estão distribuídas em quatro principais grupos: 1) *Coccidia* Leuckart, 1879: *Eimeria* Schneider, 1875, *Cyclospora* Schneider, 1881, *Isospora* Schneider, 1881, *Sarcocystis* Lankester, 1882, *Aggregata* Frenzel, 1885, *Haemogregarina* Danilewsky, 1885, *Goussia* Labbé, 1896, *Lankesterella* Labbé, 1899, *Klossiella* Smith e Johnson, 1902, *Caryospora* Leger, 1904, *Hepatozoon* Miller, 1908, *Toxoplasma* Nicolle e Manceaux, 1908, *Adelina* Hesse, 1911, *Calyptospora* Overstreet,

Hawkins e Fournie, 1984, *Neospora* Dubey et al., 1988; Gregarinida: *Gregarina* Dufour, 1828, *Monocystis* Stein, 1848, *Selenidium* Giard, 1884, *Mattesia* Naville, 1930; Haemosporida: *Plasmodium* Marchiafava e Celli, 1885, *Haemoproteus* Kruse, 1890, *Leucocytozoon* Sakharoff, 1894 e Piroplasmida: *Babesia* Starcovici, 1893 e *Theileria*. Enquanto que, *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 pertence à Cryptosporidia que é um outro grupo independente (Morrison, 2008; Votýpka et al., 2016; Xavier et al., 2018).

Antony van Leeuwenhoek em 1674 encontrou o primeiro apicomplexo, identificado como *Eimeria stiedae* Leeuwenhoek, 1674 na vesícula biliar de um coelho, enquanto que Hake em 1839 foi o primeiro a descrever os oocistos (Levine, 1988b). Posteriormente, novas espécies foram identificadas e foi realizado a primeira análise do DNA do apicomplexo que causa a malária aviária (Kilejian, 1974).

O primeiro registro de oocistos em peixes foi realizado por Thélohan em 1890 e outros relatos de apicomplexos em peixes marinhos e de água doce foram feitos em diversos países, sendo que, alguns estudos utilizaram caracterização morfológica, outros ultraestruturais, filogenéticas e/ou patológicas, porém ainda há pouco estudo dos parasitos do filo Apicomplexa em ambiente aquático e poucas informações sobre as doenças causadas em peixes (Eiras et al., 2016).

A história filogenética mostra que os apicomplexos contêm uma organela conhecida como apicoplasto, sendo plastídios não fotossintéticos, que são considerados plastídeos secundários de origem de algas vermelhas (Sato, 2011). Além disso, estão relacionados aos dinoflagelados e ciliados e estão inseridos no grupo Alveolata (Adl et al., 2005; Morrison, 2009).

As espécies dentro do filo Apicomplexa formam esporos e/ou oocistos infectantes que são liberados no meio ambiente após excreção ou morte do hospedeiro (Votýpka et al., 2016). O diagnóstico taxonômico é feito a partir das características morfológicas e ultraestruturais dos esporos, mas para estudos complementares a nível de identificação de espécies é necessário realizar estudos de biologia molecular e análises filogenéticas (Whipps et al., 2012; Votýpka et al., 2016).

Os apicomplexos tem como característica morfológica principal o complexo apical, o qual facilita a fixação e entrada do parasito na célula hospedeira e é composto por anel polar, roptrias, micronemas e conoide (**Figura 2**) (Levine, 1988b; Davies, 1995; Siddall, 1995; Sato, 2011).

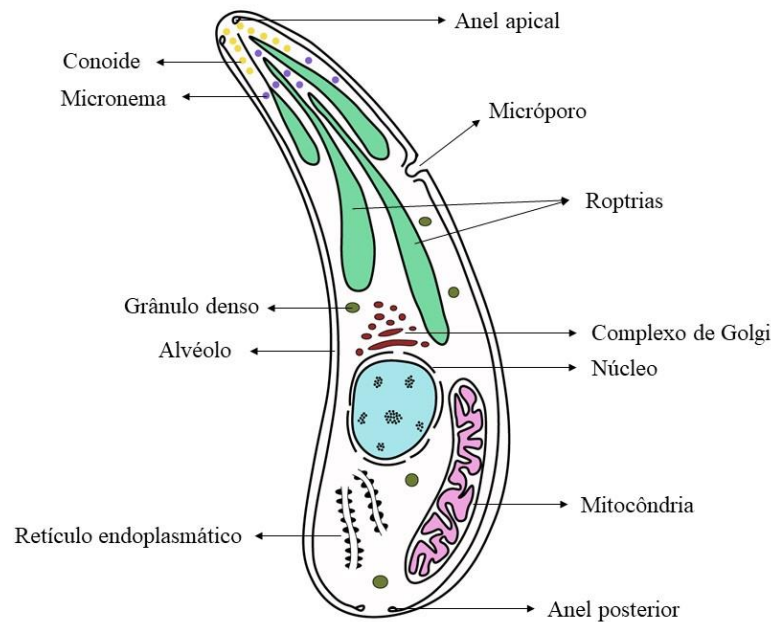


Figura 2. Desenho esquemático geral do esporo de apicomplexo. Fonte: Adaptado de Ruppert et al. (2005).

Dependendo das espécies de parasitos dentro do filo Apicomplexa, o ciclo de vida pode consistir em três estágios de desenvolvimento: merogonia, gametogonia e esporogonia (Rohde, 2005; Sato, 2011). O início da infecção é a partir da liberação do esporozoíto (esporos) do oocisto, após o esporozoíto irá infectar a célula hospedeira através do complexo apical e após essa fase, o esporozoíto desenvolve-se em meronte que se divide em merozoítos, correspondendo a fase assexuada, estes tendem a invadir outras células hospedeiras (Rohde, 2005; Sato, 2011). A fase gametogonia corresponde a fase sexuada, no qual os merozoítos tornam-se gamontes e formam-se em gametas feminino e masculino, desenvolvendo-se em macrogametócitos femininos e microgametócitos masculinos (Rohde, 2005; Sato, 2011). A fecundação ocorre formando um zigoto que se divide como oocistos esporulados ou não esporulados (Siddall, 1995; Votýpka et al., 2016; Azmi et al., 2018).

Os principais parasitos dentro do filo Apicomplexa que parasitam peixes fazem parte dos grupos: Coccidia, sendo os gêneros mais comuns *Eimeria*, *Crystallospora*, *Goussia* e *Calyptospora* (Rohde, 2005; Molnár et al., 2012; Whipps et al., 2012; Xavier

et al., 2018) e Adeleorina, com os principais gêneros *Haemogregarina*, *Hepatozoon* 8, *Cyrtia* e *Desseria* (Siddall, 1995).

Os parasitos Apicomplexa têm possibilidade de infectar qualquer tecido do hospedeiro, podendo ter uma localização intracitoplasmática, extracitoplasmática e até mesmo dentro do núcleo da célula hospedeira, no entanto, nos peixes formam oocistos principalmente no trato digestório, mas podem ser formados em outros órgãos, como rim, bazo, fígado e bexiga natatória (Davies e Ball, 1993; Votýpka et al., 2016).

Em relação as doenças causadas por esses microparasitos nos peixes pode ser considerada baixa, mesmo quando uma há alta contaminação nos órgãos, porém dependendo das espécies podem causar infecções graves e mortalidade do hospedeiro (Sindermann, 1987; Hemmer e Steinhagenl, 1998).

1.2.3. Myxozoa Grassé, 1970

Mixozoários são endoparasitos obrigatórios principalmente de peixes dulcícolas e marinhos, embora há estudos de mixozoários parasitando anelídeos, briozoários, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Lom e Dyková, 2006; Bartholomew et al., 2008; Fiala et al., 2015). Os mixozoários anteriormente foram classificados como protozoários dentro de Sporozoa (Leuckart, 1879), porém a partir de análises moleculares do gene *ssrDNA* verificou-se que os mixozoários estavam relacionados aos metazoários pelo fato de serem organismos multicelulares e com diferenciação celular (Smothers et al., 1994; Canning e Okamura, 2004; Fiala et al., 2015; Okamura et al., 2015).

Nos estudos desenvolvidos por Siddall et al. (1995) e Nesnidal et al. (2013) foram realizadas análises ultraestruturais em conjunto com análises moleculares do gene *ssrDNA*, evidenciando a análise filogenética dos mixozoários, podendo então verificar a relação destes com os cnidários e colaborando para a colocação da classe Myxozoa dentro do filo Cnidaria Hatschek, 1888, grupo no qual estão os corais, anêmonas do mar, água-viva e hidroides (Siddall et al., 1995; Jiménez-Guri et al., 2007; Chang et al., 2015). Assim também confirmando que os mixozoários estão intimamente relacionados como taxa-irmãos com *Polypodium hydriforme* (Ussov, 1885) (Okamura e Gruhl, 2021). Os mixozoários englobam em torno de 20% em relação à outras espécies de cnidários de vida livre já descritos, sendo que há aproximadamente 64 gêneros e cerca de 2600 espécies de mixozoários descritos (Lom e Dyková, 2006; Okamura et al., 2015, 2018; Vidal et al., 2017; Atkinson et al., 2018; Okamura e Gruhl, 2021).

Anteriormente os mixozoários eram divididos na classe Myxosporea Bütschli, 1881, sendo composta por espécies que infectavam hospedeiros vertebrados e classe Actinosporea Noble, 1980 determinados por espécies que parasitavam os hospedeiros invertebrados, como os anelídeos (Kent et al., 1994). Kent et al. (1994) sugeriram anulação da classe Actinosporea, pois obtiveram o conhecimento que actinosporos e mixoesporos pertenciam à mesma espécie, com fases morfologicamente diferentes.

Portanto, os mixozoários estão divididos em duas subclasses: subclasse Myxosporea Bütschli, 1881 que incluem duas ordens baseadas no número de valvas: ordem Bivalvulida Schulman, 1959 e Multivalvulida Shulman, 1959 e subclasse Malacospora Canning, Curry, Feist, Longshaw e Okamura, 2000 composta por mixozoários que parasitam os briozoários como hospedeiros invertebrados e apenas os peixes como hospedeiros vertebrados (Rangel et al., 2015).

A ordem Bivalvulida é composta por 13 famílias (Chloromyxidae Thélohan, 1892, Myxidiidae Thélohan, 1892, Myxobolidae Thélohan, 1892, Ceratomyxidae Doflein, 1899, Coccomyxidae Léger e Hesse, 1907, Sphaerosporidae Davis, 1917, Myxobilatidae Shulman, 1953, Parvicapsulidae Shulman, 1953, Sinuolineidae Shulman, 1959, Fabesporidae Naidenova e Zaika, 1969, Alatosporidae Shulman, Kovaleva e Dubina 1979, Ortholineidae Lom e Noble, 1984, Sphaeromyxidae Lom e Noble, 1984) nas quais os esporos possuem duas valvas e geralmente duas cápsulas polares. A ordem Multivalvulida é composta por três famílias (Trilosporidae Shulman, 1959, Kudoidae Meglitsch, 1960, Spinavaculidae Hsieh e Xiao Chongxue, 1993) nas quais os esporos possuem mais de duas valvas e mais que duas cápsulas polares (Kent et al., 2001; Whipps et al., 2004; Lom e Dyková, 2006; Fiala et al., 2015).

As principais espécies pertencem à subclasse Myxosporea e família Myxobolidae e são relatadas principalmente em peixes de água doce, consistindo principalmente em membros dos gêneros *Myxobolus* Bütschli, 1882 e *Henneguya* Thélohan, 1892 (Kent et al., 2001). O gênero *Myxobolus* possui cerca de 850 espécies e destas, poucas espécies foram descritas parasitando peixes de água doce na América do Sul (Eiras et al., 2005, 2014, 2021). O gênero *Henneguya* compreende em torno de 200 espécies, sendo que a maioria destas espécies foram descritas em peixes de água doce da América do Sul (Eiras 2002; Eiras e Adriano, 2012). Algumas espécies pertencentes ao gênero *Kudoa* Meglitsch, 1947 também podem ser consideradas economicamente importante, porém no Brasil, há poucos registros de espécies desse gênero em peixes de água doce, como

podemos observar nos trabalhos de Casal et al. (2008); Azevedo et al. (2015); Velasco et al. (2015, 2019); Santos et al. (2019) e Silva et al. (2022).

Na subclasse Malacosporea há apenas dois gêneros: *Buddenbrockia* Schröder, 1910 e *Tetracapsuloides* Canning, Tops, Curry, Wood e Okamura, 2002, com apenas quatro espécies, estes parasitam briozoários de água doce e são responsáveis por causarem doenças em peixes salmonídeos, principalmente a doença renal proliferativa - PKD (Tops et al., 2005; Lom e Dyková, 2006; Hartikainen et al., 2014).

Mixoesporos de *Myxobolus* spp. consistem geralmente em formato elipsoidal, arredondado ou cônico com duas cápsulas polares, no qual internamente há os túbulos polares, enquanto que os mixoesporos de *Henneguya* spp. consistem principalmente em formato elipsoidal, arredondado, fusiforme ou cônico, também com cápsulas polares e túbulos polares, mas com uma característica diferenciada, que são a presença de apêndices caudais, ou seja, as extensões das valvas na parte posterior dos mixoesporos, está é uma característica morfológica utilizada para diferenciar as espécies de *Henneguya* das espécies de *Myxobolus* (Figura 3) (Lom e Dyková, 2006).

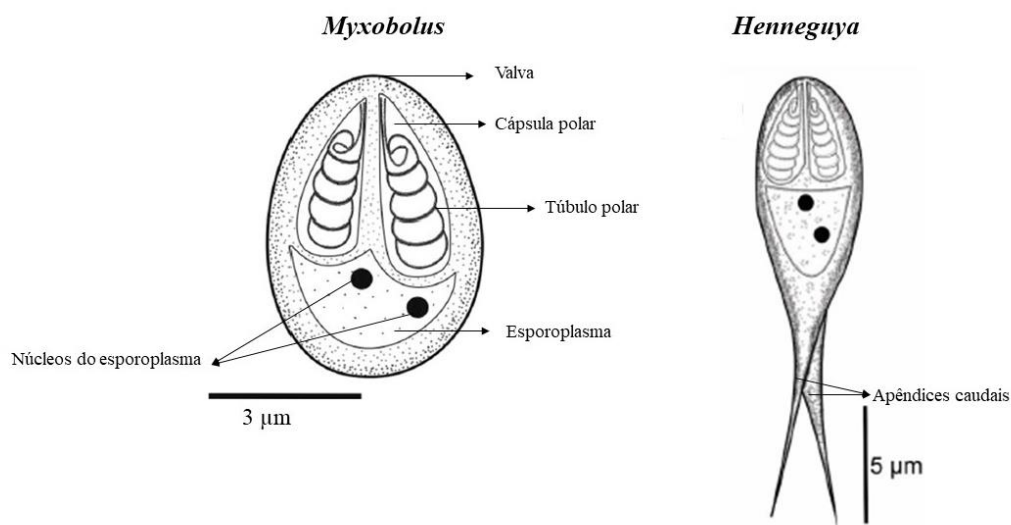


Figura 3. Características morfológicas dos mixoesporos dos gêneros *Myxobolus* e *Henneguya*. Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2018, 2020).

As cápsulas polares presente nos mixozoários são semelhantes aos nematocistos de outros cnidários, porém as cápsulas polares que constituem os esporos de mixozoários servem para prender no hospedeiro e iniciar a infecção, já o nematocisto em cnidários de vida livre possuem um túbulo permanente, que tem a função de defesa, alimentação e

adesão ao hospedeiro (Americus et al., 2020). Quanto aos actinosporos, esses são trirradiados com três cápsulas polares e três válvulas (Canning e Okamura, 2004).

Desde o primeiro mixozoário encontrado por Jurine em 1825 e informações levantadas por Kudo em 1919 o número de espécies vem aumentando conforme novos estudos morfológicos, ultraestruturais, moleculares e/ou filogenéticos são realizados (Smothers et al., 1994; Andree et al., 1999; Holzer et al., 2004; Lom e Dyková, 2006).

As espécies de mixozoários possuem um ciclo de vida indireto e complexo, com dois hospedeiros, sendo os invertebrados (anelídeos oligoquetas, poliquetas ou briozoários) como hospedeiros definitivos e os vertebrados como hospedeiros intermediários ou podendo ocorrer transmissão direta (Wolf e Markiw, 1984; Kent et al., 2001; Redondo et al., 2002; Yasuda et al., 2002; Lom e Dyková, 2006; Eszterbauer et al., 2015). O ciclo inicia-se com mixoesporos ingeridos pelos hospedeiros invertebrados, sendo assim, o túbulo polar se solta da cápsula polar para que o esporo se fixe no órgão ou tecido alvo do hospedeiro, e por seguinte, o parasito se desenvolve após reprodução sexual no órgão ou tecido acometido do hospedeiro invertebrado e produz na maioria das espécies oito actinosporos (El-Matbouli e Hoffmann, 1989; Americus et al., 2020). Quando os actinosporos estão maduros são liberados dos hospedeiros invertebrados e vão para os corpos d' água, que, ao entrar em contato com o hospedeiro vertebrado, os esporoplasmas penetram, chegando ao tecido ou órgão alvo e desenvolvem-se por reprodução assexuada em mixoesporos que são liberados do hospedeiro vertebrado através das excreções, rompimento dos plasmódios ou morte do hospedeiro para o meio ambiente, onde os mixoesporos permanecem intactos até entrar em contato com o hospedeiro invertebrado e reiniciar o ciclo (El-Matbouli e Hoffmann, 1989; Americus et al., 2020).

As reações provocadas pelos mixozoários nos tecidos e órgãos dos hospedeiros são diversas em relação ao local da infecção, podendo ocorrer hiperplasia ou hipertrofia dos tecidos, degeneração da cartilagem, hemorragias, lesão, inflamação, necrose, aumento de muco, graves deformidades e mudanças no comportamento de natação dos peixes (Sindermann, 1987; Feist e Longshaw, 2006). Algumas espécies de mixozoários desenvolvem graves doenças em seus hospedeiros, como exemplo, *Tetracapsuloides bryosalmonae* Canning, Curry, Feist, Longshaw e Okamura, 1999 que causa a doença proliferativa renal (Kent e Hedrick, 1985; Hedrick et al., 1993), a doença do rodopio em peixes salmonídeos causada por *Myxobolus cerebralis* Hofer, 1903 (Wolf e Markiw, 1984; El-Matbouli e Hoffmann, 1989; El-Matbouli et al., 1995, 1999a, 1999b; Andree et

al., 1997) e a doença proliferativa das brânquias causada por *Henneguya ictaluri* Pote, Hanson e Shivaji, 2000 (Burtle et al., 1991; Styer et al., 1991; Bellerud et al., 1995). *Kudoa* spp. são conhecidas por causarem infecções graves nos músculos de peixes marinhos e raramente em peixes dulcícolas, portanto, se ocorrer a morte do hospedeiro, este parasito tem tendência em provocar a liquefação da carne do peixe, tornando-se imprópria para o consumo humano (Woo, 2006).

Registro de esporos de mixozoários encontrados nas fezes humanas foram descritos por McClelland et al. (1997); Moncada et al. (2001) e Lebbad e Willcox (1998). No Brasil, existe o registro de *Myxobolus* sp. em fezes humanas no estado do Amazonas, como também, no Brasil houve evidências da contaminação por *Kudoa* sp. em humanos que consumiram peixes parasitados e tiveram sintomas alérgicos e intoxicação alimentar (Velasco et al., 2007; Grabner et al., 2012; Kawai et al., 2012; Reis et al., 2019). Essas infecções em humanos estão relacionadas à ingestão de peixes infectados crus ou mal cozidos (Kawai et al., 2012).

As espécies de mixozoários de peixes desenvolvem-se dentro de plasmódios ou cistos e possuem preferência em parasitar brânquias e nadadeiras, provavelmente pelo contato direto com o ambiente, mas podem parasitar superfície, opérculo, olho, rim, fígado, vesícula biliar, coração, baço, gônada, testículo, cérebro, intestino, musculatura e/ou bexiga natatória (Feist e Longshaw, 2006; Lom e Dyková, 2006; Molnár e Székely, 2014; Gruhl e Okamura, 2015). Quando os plasmódios são desenvolvidos intracelular ou intercelular, os mixoesporos são histozoicos, contudo, quando os plasmódios são desenvolvidos na cavidade dos órgãos, encistados ou livres ao epitélio interno, os mixoesporos são celozoicos (Eiras et al., 2016).

1.3. Peixes hospedeiros

Há o registro de cerca de 36088 espécies de peixes distribuídos em lagos, riachos, estuários, rios e oceanos do mundo, sendo que cerca de 18242 espécies de peixes estão distribuídas nos ambientes dulcícolas e por volta de 6000 a 8000 espécies são exclusivamente da região Neotropical (Reis, 2013; Eschmeyer et al., 2016; Nelson et al., 2016).

O Brasil possui uma vasta biodiversidade principalmente em relação aos peixes de água doce que representam cerca de 70% das espécies, ou seja, em torno de 3148 espécies são conhecidas (ICMBIO, 2018). Os peixes são importante fonte de proteína

para a população de diversas regiões, além do mais, a importância econômica é vasta, sendo a produção voltada principalmente para piscicultura (Daaddy et al., 2016).

1.3.1. *Pimelodella* spp.

Há ampla diversidade de espécies distribuídas dentro do gênero *Pimelodella* Eigenmann e Eigenmann, 1888 sendo que espécimes desse gênero pertencem à família Heptapteridae Gill, 1861 e ordem Siluriformes e estão distribuídos na América do Sul e Central (Barros et al., 2011). *Pimelodella gracilis* (Valenciennes, 1835) (**Figura 4**) e *Pimelodella avanhandavae* Eigenmann, 1917 são conhecidos popularmente como “mandi”, “mandizinho” ou “mandi-chorão”, incluem indivíduos pequenos (máximo 20 cm), possuem hábito onívoro, consumindo principalmente insetos, material vegetal, escamas de peixes e sedimentos (Bockmann e Guazzelli, 2003). Têm preferência pelo hábito noturno, sendo encontrados principalmente em locais com vasta vegetação (Barros et al., 2011).

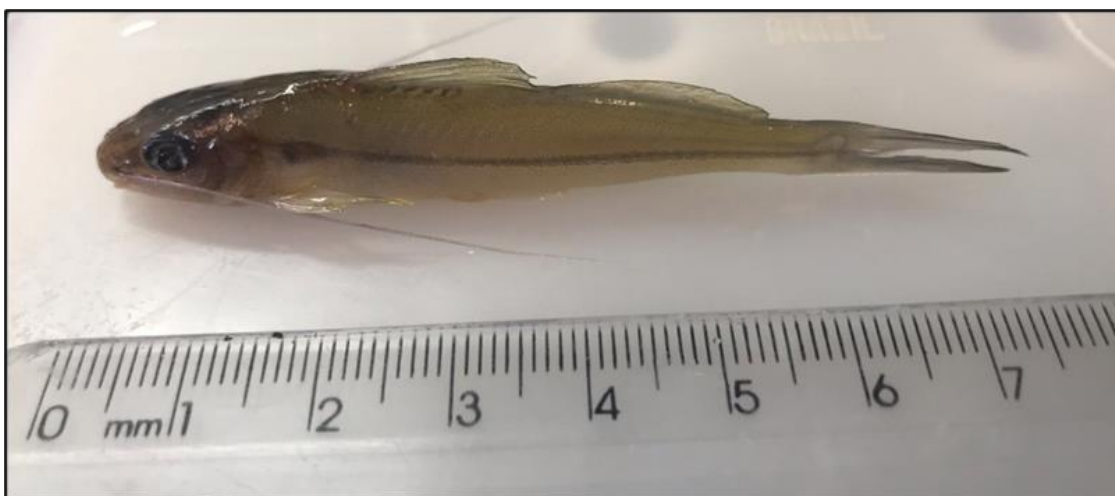


Figura 4. Espécime de *Pimelodella gracilis* (Valenciennes, 1835). Fonte: Autoria própria.

1.3.2. *Serrasalmus* spp.

Espécies do gênero *Serrasalmus* Lacepède, 1803 são endêmicas da região Neotropical e estão distribuídas na América do Sul, preferindo áreas alagadas (Sazima e Machado, 1990). *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 (**Figura 5**) pertence à família

Serrasalminae Bleeker, 1859 e ordem Characiformes, é conhecido popularmente como “piranha”, “pirambeba” ou “palometas” e possui o hábito agressivo de atacar e retirar pedaço de suas presas (Santos et al., 2006; Lopes et al., 2018). Possui hábito onívoro com tendência piscívora, consumindo partes dos peixes, como a carne, escamas e nadadeiras e pode formar cardumes de até 20 espécimes para atacar suas presas (Silva et al., 2015). É ativo durante o dia até o início da noite e são peixes de tamanho médio, podendo atingir aproximadamente 35 cm de comprimento (Sazima e Machado, 1990; Lopes et al., 2018).

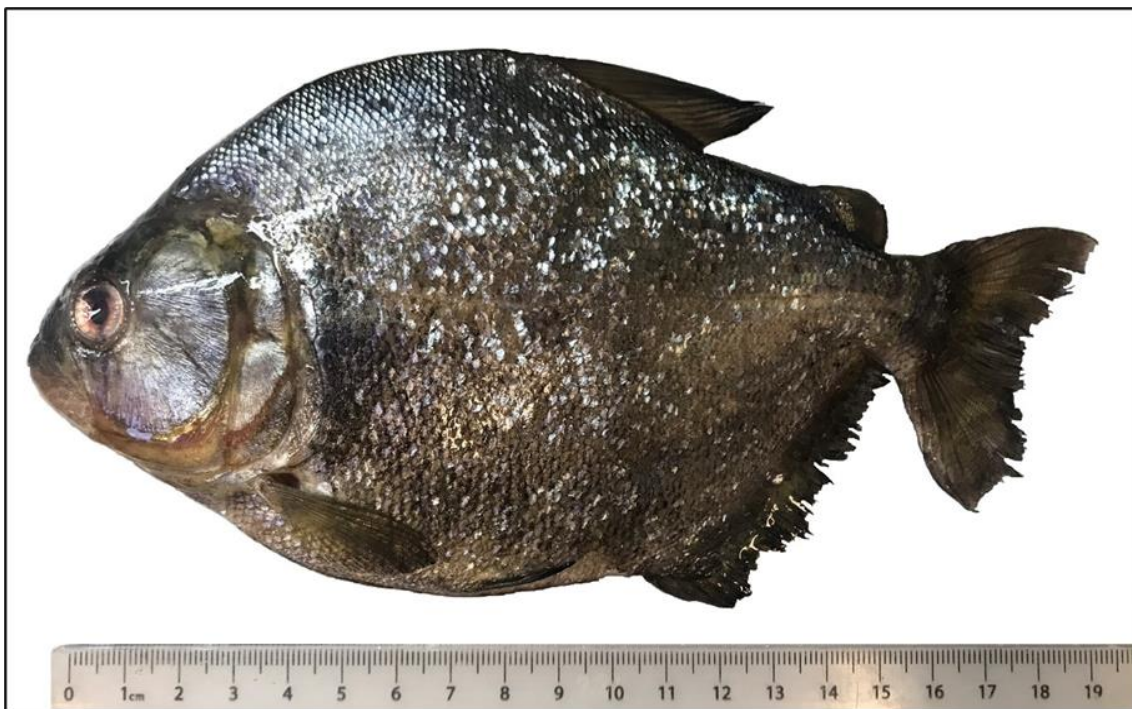


Figura 5. Espécime de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858. Fonte: Autoria própria.

1.3.3. *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831)

Astronotus ocellatus (**Figura 6**) pertence à família Cichlidae Bonaparte, 1835 e ordem Perciformes, é nativa da bacia Amazônica, distribuída no Brasil, Peru, Colômbia e Guiana Francesa, porém foi introduzida em outras bacias do nordeste e sul do Brasil sendo conhecida popularmente como “palharim”, “oscar”, “acará-açu” ou “apaiari” e são peixes ornamentais, pois apresentam coloração variada (geralmente possui superfície preta com listras laranjas) (Firouzbakhsh et al., 2011; Neves et al., 2013; Tavares-Dias e Neves, 2017; Wang et al., 2022). Possui hábito onívoro, com tendência carnívora, consumindo desde insetos até peixes pequenos (Fracalossi et al., 1998; Firouzbakhsh et

al., 2011). Essa espécie possui interesse comercial mundial, para pesca esportiva, aquarista e inclusive como fonte de proteína animal para o consumo (Mazzuchelli e Martins, 2009).



Figura 6. Espécime de *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831). Fonte: Autoria própria.

1.3.4. *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824)

Rhamdia quelen (**Figura 7**) é conhecido popularmente como “jundiá” ou “bagre” e pertence à família Heptapteridae e ordem Siluriformes, sendo encontrado na América do Sul e Central (Gomiero et al., 2007). Como características, possui espinho serrilhado nas nadadeiras peitorais e vivem no fundo de lagos e rios, principalmente junto com lama, areia, pedras e troncos e nas margens juntamente com as vegetações (Gomes et al., 2000). Possui hábito noturno e onívoro, com tendência carnívora, consumindo peixes, crustáceos, insetos e vegetais, podendo alcançar em torno de 70 cm de comprimento (Gomiero et al., 2007; Santos e Meurer, 2018). Essa espécie tem grande importância comercial para o consumo e cultivo, pois possuem altas taxas de crescimento, fácil reprodução e ausência de espinhas intramusculares (Carneiro et al., 2004; Carneiro e Mikos, 2005).



Figura 7. Espécime de *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824). Fonte: Autoria própria.

1.4. Características principais das áreas de estudo

Há 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos - UGRHI distribuídas no estado de São Paulo (**Figura 8**). Essas unidades são responsáveis pela demanda das águas correspondente a cada bacia hidrográfica (Estado de São Paulo, 2018). A Bacia Hidrográfica Tietê/Jacaré - BHTJ possui 11.785 Km² e corresponde à UGRHI 13, no qual fazem parte 34 municípios da região central do estado de São Paulo (49°32'47°30' longitude e 21°37'22°51' latitude) (Estado de São Paulo, 2018) (**Figura 9**).

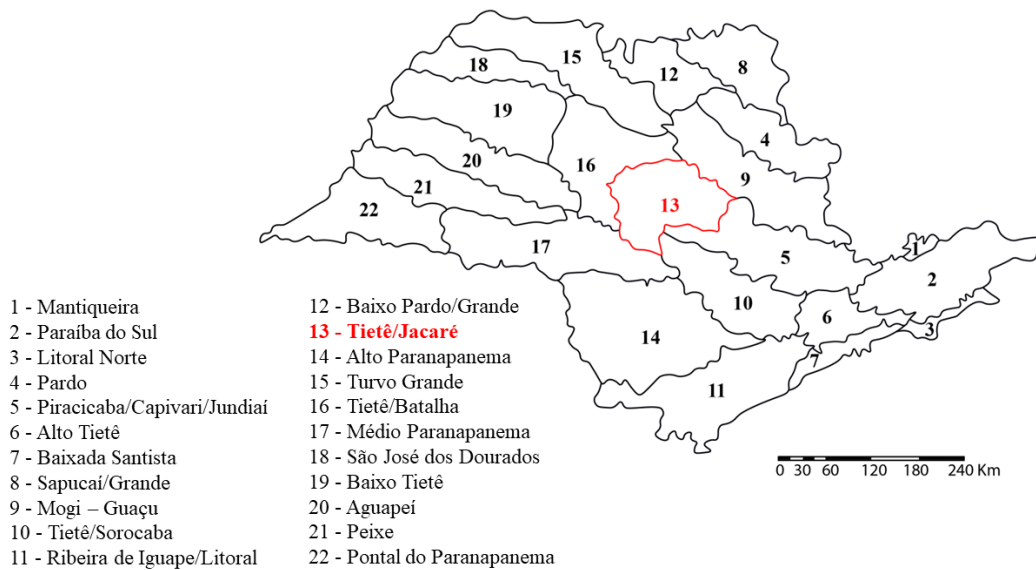


Figura 8. Representação das 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos pertencentes ao estado de São Paulo. Destaque em vermelho para a Bacia Hidrográfica Tietê/Jacaré. Fonte: Adaptado do mapa disponibilizado por Estado de São Paulo (2014).



Figura 9. Representação dos 34 municípios que fazem parte da Bacia Hidrográfica do Tietê/Jacaré. Em destaque vermelho a representação do município de Ibitinga e a indicação em azul de apenas os rios Tietê, Jacaré-Guaçu e Jacaré-Pepira. Fonte: Adaptado do mapa disponibilizado por SIGRH (2022).

A UGRHI 13 é constituída por seis sub-bacias (**Figura 10**) que englobam os três principais rios: Tietê, Jacaré-Guaçu e Jacaré-Pepira (Estado de São Paulo, 2018). Os rios Jacaré-Guaçu e Jacaré-Pepira desaguam no rio Tietê, na represa de Ibitinga (localidade de coleta dos hospedeiros) (Estado de São Paulo, 2018). Portanto, Ibitinga tem 548.79 km² de área na UGRHI-TJ (Comitê da Bacia Hidrográfica Tietê/Jacaré, 2021).

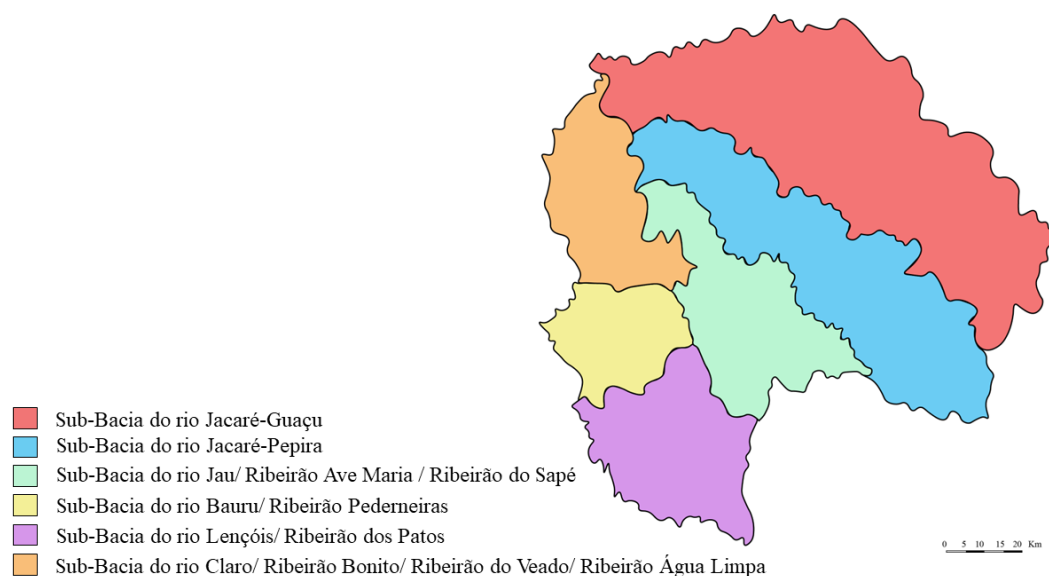


Figura 10. Representação das sub-bacias da UGRHI 13 - Tietê/Jacaré. Fonte: Adaptado de Attanasio (2014).

No quesito de preservação da vegetação, somente 9,42 % da vegetação nativa são preservadas na UGRHI Tietê/Jacaré, esse problema é acarretado pelo acelerado crescimento populacional da região e ocupação do solo sem planejamento (Tundisi et al., 2008; Estado de São Paulo, 2015). As sub-bacias Jacaré-Guaçu e Jacaré-Pepira possuem 89,1% e 86,83% de área degradada em relação a vegetação remanescente, respectivamente, porém quando comparados aos demais rios pertencentes as outras sub-bacias, os níveis de degradação para ambos os rios são menores (Estado de São Paulo, 2015).

Para proteção da Bacia Hidrográfica Tietê/Jacaré há unidades de conservação, como exemplo a Área de Proteção Ambiental - APA Ibitinga criada pela Lei Estadual nº 5.536 de 1987 que fornece proteção para os rios correspondentes ao município de Ibitinga, protegendo principalmente as áreas de várzeas formadas pelos rios Jacaré-Guaçu e Jacaré-Pepira. Essas áreas são conhecidas como “Varjão” e “Pantaninho”, respectivamente, e

pela formação do ambiente conhecido como “Pantanal Paulista”, devido a biodiversidade da flora e fauna semelhantes ao Pantanal Mato-grossense (Estado de São Paulo, 2013; Comitê da Bacia Hidrográfica Tietê/Jacaré, 2021).

Os impactos observados nas sub-bacias nas quais os hospedeiros foram coletados são considerados a seguir: na sub-bacia do rio Jacaré-Guaçu há despejo de resíduos sólidos de forma inadequada e poluição do solo; na sub-bacia do rio Jacaré-Pepira há presença de erosão do solo, desmatamento e uso excessivo de agrotóxico (Estado de São Paulo, 2018). Mesmo com esses problemas, essas duas sub-bacias são as áreas com menos degradação e poluição comparada à outras sub-bacias. A sub-bacia Jacaré-Pepira possui os melhores níveis de conservação, com vasta biodiversidade da fauna e flora (Comitê da Bacia Hidrográfica Tietê/Jacaré, 2017).

Em relação ao rio Tietê, este é economicamente importante para o estado de São Paulo, porém possui diversos impactos ambientais. Contudo no município de Ibitinga exibe uma água consideravelmente limpa, com a presença de oxigênio e consequentemente com uma maior diversidade de peixes (Andrade, 2010; Rezende et al., 2018).

Mesmo com a implantação de projetos para a proteção e conservação dos ecossistemas aquáticos, ainda podemos observar que a qualidade dos recursos hídricos em certas regiões continua degradada, aumentando a vulnerabilidade ambiental, principalmente devido ao uso do solo, das atividades antrópicas e pela grande concentração das populações nas áreas urbanas (Tundisi et al., 2008). Dessa maneira, quando os níveis de contaminação, poluição e eutrofização dos rios são elevados, os organismos aquáticos podem ser prejudicados por esses estressores ambientais (Tundisi et al., 2008).

Portanto, a escolha dos rios Jacaré-Guaçu, Jacaré-Pepira e Tietê para a coleta dos peixes foi devido à biodiversidade de espécies de peixes presentes e pelas características e importância de cada rio. Assim como, são poucos os registros de parasitos encontrados em espécies de peixes nestas localizações geográficas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Analisar microparasitos presentes nas seguintes espécies de peixes: *A. ocellatus*, *P. avanhandavae*, *P. gracilis*, *R. quelen*, *Serrasalmus* sp. Lacepède, 1803 e *S. maculatus*, provenientes dos rios Tietê, Jacaré-Pepira e Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil e identificar as possíveis novas espécies de microparasitos a fim de contribuir com o conhecimento da biodiversidade local e global.

2.2. Objetivos específicos

- Descrever os aspectos morfológicos dos microparasitos;
- Realizar análises moleculares e filogenéticas dos microparasitos coletados;
- Registrar a ocorrência de microparasitos em novos hospedeiros e novas localidades geográficas;
- Identificar as doenças causadas pelos microparasitos nas espécies hospedeiras.

3. Material e métodos

Entre toda a biodiversidade de peixe presente nos rios Tietê, Jacaré-Guaçu e Jacaré-Pepira, foram eleitas as espécies de peixes (**Tabela 1**) de interesse econômico e hábitos diferentes. Ao total foram coletados 9 exemplares de *A. ocellatus*, 1 exemplar de *P. avanhandavae*, 46 exemplares de *P. gracilis*, 6 exemplares de *R. quelen*, 1 exemplar de *Serrasalmus* sp. e 42 exemplares de *S. maculatus* sob licença do “Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade” (SISBio nº 55914-2) e sob autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 1109) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu.

Tabela 1. Relação da quantidade de espécimes de peixes coletados nos rios Jacaré-Pepira, Jacaré-Guaçu e Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. Ausência de hospedeiros coletados (X). O período de coleta dos hospedeiros encontra-se entre parênteses.

Espécies	Jacaré-Pepira	Jacaré-Guaçu	Tietê
<i>Pimelodella gracilis</i> (Depósito nº LBP 27250)	X	46 espécimes (entre agosto de 2018 e maio de 2019)	X
<i>Pimelodella avanhandavae</i>	X	1 espécime (maio de 2019)	X
<i>Serrasalmus maculatus</i> (Depósito nº LBP 11923)	9 espécimes (entre julho e setembro de 2018)	11 espécimes (entre abril de 2018 e março de 2019)	22 espécimes (entre junho e setembro de 2018)
<i>Serrasalmus</i> sp.	1 espécime (setembro de 2018)	X	X
<i>Rhamdia quelen</i>	1 espécime (março de 2019)	5 espécimes (entre agosto de 2018 e abril de 2019)	X
<i>Astronotus ocellatus</i>	X	5 espécimes (entre agosto e setembro de 2019)	4 espécimes (entre agosto e setembro de 2018)

3.1. Coleta e análise dos espécimes hospedeiros

As coletas dos peixes foram realizadas com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, nº 1109 (**Anexo 1**). Os peixes foram submetidos à narcose que foi induzida utilizando Eugenol (óleo de cravo) e sacrificados através do método físico de secção medular e acondicionados em sacos plásticos e transportados ao Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres - LAPAS, localizado no departamento de Biodiversidade e Bioestatística, setor de Parasitologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, campus Botucatu. As demais etapas do material e métodos deste trabalho, como processamento dos microparasitos, análises estatísticas, morfométrica, histológica, ultraestrutural, molecular e filogenética estão detalhadas nos próximos capítulos.

4. Referências

- Abdel-Ghaffar, F., Bashtar, A. R., Mehlhorn, H., Al-Rasheid, K., Morsy, K. (2011). Microsporidian parasites: A danger facing marine fishes of the Red Sea. *Parasitology Research*, 108(1), 219-225.
- Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., ... Taylor, M. F. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), 399-451.
- Americus, B., Lotan, T., Bartholomew, J. L.; Atkinson, S. D. (2020). A comparison of the structure and function of nematocysts in free-living and parasitic cnidarians (Myxozoa). *International Journal for Parasitology*, 50(10-11), 763-769.
- Anderson, R. M., May, R. M. (1982). Coevolution of Hosts and Parasites. *Parasitology*, 85(2), 411-426.
- Andrade, L. N. (2010). Autodepuração dos corpos d'água. *Revista da Biologia*, 5, 16-19.
- Andree, K. B., Gresoviac, S. J., Hedrick, R. P. (1997). Small subunit ribosomal RNA sequences unite alternate actinosporean and myxosporean stages of *Myxobolus cerebralis* the causative agent of whirling disease in salmonid fish. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 44(3), 208-215.
- Andree, K. B., Székely, C., Molnár, K., Gresoviac, S. J., Hedrick, R. P. (1999). Relationships among Members of the Genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bilvalvidae) Based on Small Subunit Ribosomal DNA Sequences. *The Journal of Parasitology*, 85(1), 68.
- Arnott, S. A., Barber, I., Huntingford, F. A. (2000). Parasite-associated growth enhancement in a fish-cestode system. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1444), 657-663.

Arisue, N., Hashimoto, T. (2015). Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitology International*, 64(3), 254-259.

Atkinson, S. D., Bartholomew, J. L., Lotan, T. (2018). Myxozoans: Ancient metazoan parasites find a home in phylum Cnidaria. *Zoology*, 129, 66-68.

Attanasio, C. M. (2014). Guia de Restauração de Matas para a Bacia Hidrográfica do Tietê-Jacaré (UGRHI no13). Jahu-SP: Instituto Pró-Terra, p. 40.

Azevedo, C., Rocha, S., Matos, E., Oliveira, E., Matos, P., Al-Quraishy, S., Casal, G. (2015). Ultrastructural and Phylogenetic Description of *Kudoa orbicularis* n. Sp. (Myxosporidia: Multivalvulida): A Parasite Infecting the Muscle of the Fish *Chaetobranchopsis orbicularis* (Teleostei: Cichlidae) in the Amazon Region. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(1), 27-36.

Azmi, N. F., Ghaffar, M. A., Cob, Z. C. (2018). Apicomplexa-like parasites in some gastropods from Merambong seagrass bed, Johor Straits, Malaysia. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(2), 1-6.

Barber, I. (2005). Parasites grow larger in faster growing fish hosts. *International Journal for Parasitology*, 35(2), 137-143.

Barber, I., Dingemanse, N. J. (2010). Parasitism and the evolutionary ecology of animal personality. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1560), 4077-4088.

Barros, N. H. C., Nascimento, W. S., Araújo, A. S., Gurgel, L. L., Chellappa, A. S. (2011). Aspectos Reprodutivos de *Pimelodella gracilis* (Valenciennes, 1835) (Osteichthyes: Pimelodidae) do Açude da Ecoregião Caatinga. *Biota Amazônia*, 1(2), 53-59.

Bartholomew, J. L., Atkinson, S. D., Hallett, S. L., Lowenstine, L. J., Garner, M. M., Gardiner, C. H., Rideout, B. A., Keel, M. K., Brown, J. D. (2008). Myxozoan parasitism in waterfowl. *International Journal for Parasitology*, 38(10), 1199-1207.

Behringer, D. C., Karvonen, A., Bojko, J. (2018). Parasite avoidance behaviours in aquatic environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1751), 20170202.

Bellerud, B. L., Pote, L. M., Lin, T. L., Johnson, M. J., Boyle, C. R. (1995). Etiological and epizootological factors associated with outbreaks of proliferative gill disease in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 7(2), 124.

Bigliardi, E., Sacchi, L. (2001). Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and Infection*, 3(5), 373-379.

Bockmann, F. A, Guazzelli, G. M. (2003). Heptapteridae (Heptapterids). In: Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris, C.J. Jr. (eds.). Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 406-431.

Buck, J. C., Weinstein, S. B., Young, H. S. (2018). Ecological and Evolutionary Consequences of Parasite Avoidance. *Trends in Ecology and Evolution*, 33(8), 619-632.

Burtle, G. J., Harrison, L. R., Styer, E. L. (1991). Detection of triactinomyxid myxozoan in an oligochaete from ponds with proliferative gill disease in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 3, 281-287.

Cali, J. J., Becnel, P. M. T. (2017). Microsporidia. *Springer International Publishing*.

Canning, E. U., Okamura, B. (2004). Biodiversity and Evolution of the Myxozoa. *Advances in Parasitology*, 56(03), 43-131.

Capella-Gutiérrez, S., Marcet-Houben, M., Gabaldón, T. (2012). Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biology*, 10.

Carneiro, P. C., Mikos, J. D., Bendhack, F., Ignácio, S. A. (2004). Processamento do jundiá *Rhamdia quelen*: rendimento de carcaça. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, 2(3), 1.

Carneiro, P. C. F., Mikos, J. D. (2005). Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. *Ciência Rural*, 35(1), 187-191.

Casal, G., Matos, E., Matos, P., Azevedo, C. (2008). Ultrastructural Description of a New Myxosporean Parasite *Kudoa aequidens* sp. n. (Myxozoa, Myxosporea), found in the Sub-Opercular Musculature of *Aequidens plagiozonatus* (Teleostei) from the Amazon River. *Acta Protozoologica*, 47, 135-141.

Casal, G., Matos, E., Rocha, S., Sindeaux-Neto, J., Al-Quraishy, S., Azevedo, C. (2016). Ultrastructure and phylogeny of *Pleistophora beebei* sp. nov. (microsporidia) infecting the Amazonian teleostean *Brachyhypopomus beebei* (fam. hypopomidae). *Acta Protozoologica*, 55(4), 259-268.

Chang, E. S., Neuhoof, M., Rubinstein, N. D., Diamant, A., Philippe, H., Huchon, D.; Cartwright, P. (2015). Genomic insights into the evolutionary origin of Myxozoa within Cnidaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(48), 14912-14917.

Comitê da Bacia Hidrográfica Tietê/Jacaré. (2017). *Relatório de Situação dos Recursos Hídricos 2017*.

Comitê da Bacia Hidrográfica Tietê/Jacaré. (2021). *Relatório de Situação dos Recursos Hídricos 2021*.

Daaddy, M. D. V., Santos, C., Brandão, R. M. L., Amanajás, R. D., Ribeiro, A. B. N. (2016). Pesca do apaiari, *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831), e perfil socioeconômico dos pescadores artesanais de uma região da Amazônia brasileira. *Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi: Ciências Humanas*, 11(2), 363-378.

Davies, A. J., Ball, S. J. (1993). The Biology of Fish Coccidia. *Advances in Parasitology*, 32, 293-366.

- Davies, A. J. (1995). The biology of fish haemogregarines. *Advances in Parasitology*, 36, 191-201.
- Ducatez, S., Lefebvre, L., Sayol, F., Audet, J. N., Sol, D. (2020). Host Cognition and Parasitism in Birds: A Review of the Main Mechanisms. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 1-15.
- Eiras, J. C. (2002). Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Systematic Parasitology*, 52(1), 43-54.
- Eiras, J. C., Molnár, K., Lu, Y. S. (2005). Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Systematic Parasitology*, 61(1), 1-46.
- Eiras, J. C., Adriano, E. A. (2012). A checklist of new species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2002 and 2012. *Systematic Parasitology*, 83(2), 95-104.
- Eiras, J. C., Zhang, J., Molnár, K. (2014). Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. *Systematic Parasitology*, 88(1), 11-36.
- Eiras J. C., Velosso A. L., Pereira Jr. J. (2016). Parasitos de peixes marinhos da América do Sul. Rio Grande: *Editora da FURG*, 441p.
- Eiras, J. C., Cruz, C. F., Saraiva, A., Adriano, E. A. (2021). Synopsis of the species of *Myxobolus* (Cnidaria, Myxozoa, Myxosporea) described between 2014 and 2020. *Folia Parasitologica*, 68, 1-19.
- El-Matbouli, M., Hoffmann, R. W. (1989). Experimental transmission of two *Myxobolus* spp. developing bisporogeny via tubificid worms. *Parasitology Research*, 75, 461-464.
- El-Matbouli, M., Hoffmann, R. W., Mandok, C. (1995). Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout cartilage. *Journal of Fish Biology*, 46(6), 919-935.

El-Matbouli, M., Hoffmann, R. W., Schoel, H., Mcdowell, T. S., Hedrick, R. P. (1999a). Whirling Disease: host specificity and interaction between the actinosporean stage of *Myxobolus cerebralis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 35, 1-12.

El-Matbouli, M., Mcdowell, T. S., Antonio, D. B., Andree, K. B. (1999b). Effect of water temperature on the development, release and survival of the triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis* in its oligochaete host. *International Journal for Parasitology*, 29(4), 627-641.

Eschmeyer, W. N., R., Fricke; Van Der Laan, R. (2016). Catalog of Fishes: Genera, Species, References.

Eszterbauer, E., Atkinson, S., Diamant, A., Morris, D., El-Matbouli, M., Hartikainen, H. (2015). Myxozoan life cycles: practical approaches and insights. In: Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J. L. *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Switzerland: Springer International Publishing, p. 441.

Estado de São Paulo (2013). APA Ibitinga: Pantanal Paulista Patrimônio Socioambiental do Interior do Estado de São Paulo.

Estado de São Paulo (2014). Plano estadual de recursos hídricos / Plano cartográfico do estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.igc.sp.gov.br/produtos/ugrhi.html>. Acesso em: 31 jan. 2022.

Estado de São Paulo (2015). Relatório de situação dos recursos hídricos 2015: UGRHI 13 - Bacia Hidrográfica Tietê-Jacaré. Disponível em: <http://www.sigrh.sp.gov.br/cbhtj/apresentacao>. Acesso em: 31 jan. 2022.

Estado de São Paulo (2018). Plano da Bacia Hidrográfica Tietê-Jacaré: relatório II.

Ezenwa, V. O., Archie, E. A., Craft, M. E., Hawley, D. M., Martin, L. B., Moore, J., White, L. (2016). Host behaviour-parasite feedback: An essential link between animal

behaviour and disease ecology. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1828), 20153078.

Feist, S. W., Longshaw, M. (2006). Phylum Myxozoa. In: Woo, P. T. K. *Fish diseases and disorders*. Wallingford: CABI Publishing, p. 230-296.

Fiala, I., Bartošová-Sojková, P., Whipps, C. M. (2015). Classification and phylogenetics of Myxozoa. In: Okamura B. *Myxozoan evolution, ecology and development*. Cham: Springer International Publishing.

Firouzbakhsh, F., Noori, F., Khalesi, M. K., Jani-Khalili, K. (2011). Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(4), 833-842.

Fracalossi, D. M., Allen, M. E., Nichols, D. K., Oftedal, O. T. (1998). Oscars, *Astronotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamin C. *Journal of Nutrition*, 128(10), 1745-1751.

Frank, S. A. (1996). Models of parasite virulence. *Quarterly Review of Biology*, 71(1), 37-78.

Franzen, C., Müller, A. (1999). Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(2), 243-285.

Franzen, C. (2004). Microsporidia: How can they invade other cells? *Trends in Parasitology*, 20(6), 275-279.

Franzen, C. (2005). How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitologica*, 52(1-2), 36-40.

Franzen, C. (2008). Microsporidia: A Review of 150 Years of Research. *The Open Parasitology Journal*, 2, 1-34.

Garcia, L. S. (2002). Laboratory identification of the microsporidia. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 1892-1901.

Gill, E. E., Fast, N. M. (2006). Assessing the microsporidia-fungi relationship: Combined phylogenetic analysis of eight genes. *Gene*, 375(1-2), 103-109.

Gomes, L. C., Golombieski, J. I., Gomes, A. R. C., Baldisserotto, B. (2000). Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural*, 30(1), 179-185.

Gomiero, L. M., Souza, U. P., Braga, F. M. S. (2007). Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. *Biota Neotropica*, 7(3), 127-133.

Gluge, G. (1838). Notice sur quelques points d'anatomie pathologique comparée, suivie de quelques observations sur la structure des branchies dans épinoches. *Bulletins de l'Académie royale des sciences, des lettres et des beaux-arts de Belgique*, 5, 771-785.

Grabner, D. S., Yokoyama, H., Shirakashi, S., Kinami, R. (2012). Diagnostic PCR assays to detect and differentiate *Kudoa septempunctata*, *K. thyrsites* and *K. lateolabracis* (Myxozoa, Multivalvulida) in muscle tissue of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 338-341(5), 36-40.

Gruhl, A., Okamura, B. (2015). Tissue Characteristics and Development in Myxozoa. *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*, p. 1-441.

Han, B., Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiology Spectrum*, 5(2).

Hart, B. L. (1990). Behavioral adaptations to pathogens and parasites: Five strategies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 14(3), 273-294.

Hartikainen, H., Gruhl, A., Okamura, B. (2014). Diversification and repeated morphological transitions in endoparasitic cnidarians (Myxozoa: Malacosporea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 76(1), 261-269.

Hawley, D. M., Gibson, A. K., Townsend, A. K., Craft, M. E., Stephenson, J. F. (2021). Bidirectional interactions between host social behaviour and parasites arise through ecological and evolutionary processes. *Parasitology*, 148(3), 274-288.

Hedrick, R. P., Macconnell, E., de Kinkelin, P. (1993). Proliferative kidney disease of salmonid fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 277-290.

Hemmer, N., Steinhagenl, G. D. (1998). Changes of intestinal epithelial structure and cell turnover in carp *Cyprinus carpio* infected with *Goussia carpelli* (Protozoa: Apicomplexa). *Diseases of Aquatic Organisms*, 34, 39-44.

Holzer, A. S., Sommerville, C., Wootten, R. (2004). Molecular relationships and phylogeny in a community of myxosporeans and actinosporeans based on their 18S rDNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 34(10), 1099-1111.

ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (2018). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Peixes.

Jiménez-Guri, E., Okamura, B., Holland, P. W. H. (2007). Origin and evolution of a myxozoan worm. *Integrative and Comparative Biology*, 47(5), 752-758.

Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., Vivarès, C. P. (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414(6862), 450-453.

Kawai, T., Sekizuka, T., Yahata, Y., Kuroda, M., Kumeda, Y., Iijima, Y., Kamata, Y. (2012). Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. *Clinical Infectious Diseases*, 54(8), 1046-1052.

Keeling, P. J., Fast, N. M. (2002). Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology*, 56, 93-116.

Keeling, P. (2009). Five questions about microsporidia. *PLoS Pathogens*, 5(9), 1-4.

Kent, M. L., Hedrick, R. P. (1985). PKX, the Causative Agent of Proliferative Kidney Disease (PKD) in Pacific Salmonid Fishes and Its Affinities with the Myxozoa. *The Journal of Protozoology*, 32(2), 254-260.

Kent, M. L., Margolis, L., Corliss, J. O. (1994). The demise of a class of protists: taxonomic and nomenclatural revisions proposed for the protest phylum Myxozoa Grassé, 1970. *Canadian Journal of Zoology*, 72(5), 932-937.

Kent, M. L., Andree, K. B., Bartholomew, J. L., El-Matbouli, M., Desser, S. S., Devlin, R. H., Feist, S. W., Hedrick, R. P., Hoffmann, R. W., Khattra, J., Hallett, S. L., Lester, R. J., Longshaw, M., Palenzeula, O., Siddall, M. E., Xiao, C. (2001). Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(4), 395-413.

Kent, M. L., Shaw, R. W., Sanders, J. L. (2014). Chapter 20: Microsporidia in Fish. *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*, 493-520.

Kilejian, A. (1974). Mitochondrial DNA, from *Plasmodium lophurae*. *Journal of Protozoology*, 21, 434.

Lafferty, K. D., Kuris, A. M. (1999). How environmental stress affects the impacts of parasites. *Limnology and Oceanography*, 44(3), 925-931.

Lafferty, K. D., Shaw, J. C. (2013). Comparing mechanisms of host manipulation across host and parasite taxa. *Journal of Experimental Biology*, 216(1), 56-66.

Lebbad, M., Willcox, M. (1998). Spores of *Henneguya salminicola* in human stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(6), 1820.

- Lee, S. C., Corradi, N., Byrnes, E. J., Torres-Martinez, S., Dietrich, F. S., Keeling, P. J., Heitman, J. (2008). Microsporidia Evolved from Ancestral Sexual Fungi. *Current Biology*, 18(21), 1675-1679.
- Levine, N. D. (1894). Nomenclatural Corrections and New Taxa in the Apicomplexan Protozoa. *Transactions of the American Microscopical Society*, 103(2), 195-204.
- Levine, N. D. (1988a). The protozoan phylum Apicomplexa. EUA: *CRC Press*.
- Levine, N. D. (1988b). Progress in Taxonomy of the Apicomplexan Protozoa. *Journal of Protozoology*, 35(4), 518-520.
- Lom, J. (2002). A catalogue of described genera and species of microsporidians parasitic in fish. *Systematic Parasitology*, 53(2), 81-99.
- Lom, J., Nilsen, F. (2003). Fish microsporidia: Fine structural diversity and phylogeny. *International Journal for Parasitology*, 33(2), 107-127.
- Lom, J., Dyková, I. (2005). Microsporidian xenomas in fish seen in wider perspective. *Folia Parasitologica*, 52(1-2), 69-81.
- Lom, J., Dyková, I. (2006). Myxozoan genera: Definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica*, 53(1), 1-36.
- Lopes, D., Severo-Neto, F., Strietman, M. (2018). PEIXE DA VEZ - *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858.
- Luque, J. (2004). Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13(1), 161-165.
- May, R., Anderson, R. (1979). Population biology of infectious diseases: Part II. *Nature*, 280, 455-461.

- Mazzuchelli, J., Martins, C. (2009). Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica*, 136(3), 461-469.
- Mcclelland, R. S. M. C., Murphy, D. M., Cone, D. K. (1997). Report of Spores of *Henneguya salminicola* (Myxozoa) in Human Stool Specimens: Possible Source of Confusion with Human Spermatozoa. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2815-2818.
- Molnár, K., Ostoros, G., Dunams-Morel, D., Rosenthal, B. M. (2012). *Eimeria* that infect fish are diverse and are related to, but distinct from, those that infect terrestrial vertebrates. *Infection. Genetics and Evolution*, 12(8), 1810-1815.
- Molnár, K., Székely, C. (2014). Tissue preference of some myxobolids (Myxozoa: Myxosporidia) from the musculature of European freshwater fishes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 107(3), 191-198.
- Moncada, L. I., López, M. C., Murcia, M. I., Nicholls, S., León, F., Guío, O. L., Corredor, A. (2001). *Myxobolus* sp., another opportunistic parasite in immunosuppressed patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1938-1940.
- Moniez, R. (1887). Observations pour la revision des Microsporidies. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 104, 1312-1315.
- Moore, J. (2002). *Parasites and the behaviour of animals*. Oxford Series in Ecology and Evolution.
- Morand, S. (2015). (macro-) Evolutionary ecology of parasite diversity: From determinants of parasite species richness to host diversification. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(1), 80-87.
- Morrison, D. A. (2008). Prospects for elucidating the phylogeny of the Apicomplexa. *Parasite*, 15(3), 191-196.

- Morrison, D. A. (2009). Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends in Parasitology*, 25(8), 375-382.
- Nägeli, C. (1857). Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Botanische Zeitung*, 15, 60-761.
- Nelson, J. S., Grande, T. C., Wilson, M. V. H. (2016). *Fishes of the World*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley and Sons.
- Nesnidal, M. P., Helmkampf, M., Bruchhaus, I., El-Matbouli, M, Hausdorf, B. (2013). Agent of Whirling Disease Meets Orphan Worm: Phylogenomic Analyses Firmly Place Myxozoa in Cnidaria. *PLoS One*, 8(1): e54576.
- Neves, L. R., Pereira, F. B., Tavares-Dias, M., Luque, J. L. (2013). Seasonal influence on the parasite fauna of a wild population of *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae) from the Brazilian Amazon. *The Journal of Parasitology*, 99(4), 718-721.
- Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J. L. (2015). *Myxozoan evolution, ecology and development*. London: Springer International Publishing.
- Okamura, B., Hartigan, A., Naldoni, J. (2018). Extensive Uncharted Biodiversity: The Parasite Dimension. *Integrative and comparative biology*, 58(6), 1132-1145.
- Okamura, B., Gruhl, A. (2021). Evolution, Origins and Diversification of Parasitic Cnidarians. In: *The Evolution and Fossil Record of Parasitism*, pp. 109-152.
- Park, E., Poulin, R. (2021). Revisiting the phylogeny of microsporidia. *International journal for parasitology*, 51(10), 855-864.
- Phelps, N. B. D., Goodwin, A. E. (2008). Vertical transmission of *Ovipleistophora ovariae* (Microspora) within the eggs of the golden shiner. *Journal of Aquatic Animal Health*, 20(1), 45-53.

Phelps, N. B. D., Mor, S. K., Armién, A. G., Pelican, K. M., Goyal, S. M. (2015). Description of the microsporidian parasite, *Heterosporis sutherlandae* n. sp., infecting fish in the Great Lakes Region, USA. *PLoS One*, 10(8), 1-14.

Poulin, R. (1994). The evolution of parasite manipulation of host behaviour: A theoretical analysis. *Parasitology*, 109(S1), S109-S118.

Poulin, R. (2010). Parasite Manipulation of Host Behavior: An Update and Frequently Asked Questions. *Advances in the Study of Behavior*, 41, 151-186.

Rangel, L. F., Rocha, S., Castro, R., Severino, R., Casal, G., Azevedo, C., Cavaleiro, F., Santos, M. J. (2015). The life cycle of *Ortholinea auratae* (Myxozoa: Ortholineidae) involves an actinospore of the triactinomyxon morphotype infecting a marine oligochaete. *Parasitology Research*, 114(7), 2671-2678.

Redondo, M. J., Palenzuela, A. R., Macías, Á; Álvarez-Pellitero, P. (2002). Experimental transmission of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an Enteric Parasite of Turbot *Scophthalmus maximus*. *The Journal of Parasitology*, 88(3), 482-488.

Reis, R. E. (2013). Conserving the freshwater fishes of South America. *International Zoo Yearbook*, 47(1), 65-70.

Reis, L. L., Jesus, L. C., Fernandes, O. C. C., Barroso, D. E. (2019). First report of *Myxobolus* (Cnidaria: Myxozoa) spores in human feces in Brazil. *Acta Amazonica*, 49(2), 162-165.

Rezende, L., Kaiser, I. M., Peixoto, A. S. P. (2018). Vulnerabilidade Ambiental das Margens do rio Tietê. *Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental*, 7(1), 136-166.

Rodrigues, M. V., Francisco, C. J., David, G. S., da Silva, R. J., Araújo Júnior, J. P. (2017). A new micro-sporidium species, *Nucleospora braziliensis* n. sp., infecting Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from brazilian aquaculture. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5(1), 496-505.

- Rohde, K. (2005). *Marine Parasitology*. Australia: CSIRO Publishing, 592 p.
- Ruppert, E. E., Fox, R. S., Barnes, R. D. (2005). *Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva*. São Paulo: Roca, 1045 p.
- Sánchez, C. A., Becker, D. J., Teitelbaum, C. S., Barriga, P., Brown, L. M., Majewska, A. A., Hall, R. J., Altizer, S. (2018). On the relationship between body condition and parasite infection in wildlife: a review and meta-analysis. *Ecology Letters*, 21(12), 1869-1884.
- Santos, M. H., Benedito, E., Domingues, W. M. (2006). Efeito da maturação gonadal sobre a energia dos músculos de duas espécies de piranhas do reservatório do rio Manso, Estado de Mato Grosso. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 28(3), 227-236.
- Santos, H. K., Meurer, F. (2018). Nutrition and Feeding Aspects for Jundiá (*Rhamdia quelen*) Nutrition and Feeding. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 299-309.
- Santos, W. J. P., Silva, D. T., Santos, P. F. S., Matos, E. R., Hamoy, I. G. (2019). New occurrence of *Kudoa orbicularis* parasitizing the freshwater catfish *Trachelyopterus galeatus* (Siluriformes: Auchenipteridae) in the Brazilian Amazon region. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28(3), 416-424.
- Sato, S. (2011). The apicomplexan plastid and its evolution. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(8), 1285-1296.
- Sazima, I, Machado, F. (1990). Underwater observations of piranhas in western Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 28, 17-31.
- Siddall, M. E. (1995). Phylogeny of Adeleid Blood Parasites with a Partial Systematic Revision of the Haemogregarine Complex. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 42(2), 116-125.

SIGRH - Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo (2022). Comitê de Bacia TJ Tietê-Jacaré. Disponível em: <https://sigrh.sp.gov.br/cbhtj/apresentacao>. Acesso em: 31 jan. 2022.

Shaw, R. W., Kent, M. L. (1999). Fish Microsporidia. Wittner, M., Weiss, L. M. *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington: American Society for Microbiology, 418-446.

Shaw, R.W., Kent, M. L., Adamson, M. L. (2000). Viability of *Loma salmonae* (Microsporidia) under laboratory conditions. *Parasitology Research*, 86, 978-981.

Silva, A. T., Zina, J., Ferreira, F. C., Gomiero, L. M., Golteln, R. (2015). Caudal finning by *Serrasalmus maculatus* (Characiformes: Serrasalmidae) in a small water reservoir: Seasonal variation and prey selection. *Zoologia*, 32(6), 457-462.

Silva, D. T., da Silva, M. F., Lima, A. M., Matos, P. S., de Carvalho, S. O., Matos, E. R., Hamoy, I. G. (2022). Ultrastructure and molecular phylogeny of the myxozoan *Kudoa ocellatus* n. sp. (Myxozoa: Kudoidae), a parasite of the Oscar, *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831; Teleostei: Cichlidae), a fish from northern Brazil. *Parasitology International*, 86, 102472.

Sindermann, C. J. (1987). Effects of parasites on fish populations: Practical considerations. *International Journal for Parasitology*, 17(2), 371-382.

Sitjà-Bobadilla, A. (2008). Living off a fish: a trade-off between parasites and the immune system. *Fish and Shellfish Immunology*, 25, 358-372.

Smothers, J. F., Von Dohlen, C. D., Smith, L. H., Spall, R. D. (1994). Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. *Science*, 265(5179), 1719-1721.

Sprague, V., Becnel, J. J., Hazard, E. I. (1992). Taxonomy of phylum Microspora. *Critical Reviews in Microbiology*, 18, p. 285-395.

Stentiford, G. D., Feist, S. W., Stone, D. M., Bateman, K. S., Dunn, A. M. (2013). Microsporidia: Diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems. *Trends in Parasitology*, 29(11), 567-578.

Stentiford, G. D., Becnel, -J., Weiss, L. M., Keeling, P. J., Didier, E. S., Williams, B. P., Bjornson, S., Kent, M. L., Freeman, M. A., Brown, M. J. F., Troemel, E. R., Roesel, K., Sokolova, Y., Snowden, K. F., Solter, L. (2016). Microsporidia - Emergent Pathogens in the Global Food Chain. *Trends in Parasitology*, 32(4), 336-348.

Styer, E. L., Harrison, L. R., Burtle, G. J. (1991). Communications: Experimental Production of Proliferative Gill Disease in Channel Catfish Exposed to a Myxozoan-Infected Oligochaete, *Dero digitata*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 3(4), 288-291.

Tavares-Dias, M., Neves, L. R. (2017). Diversity of parasites in wild *Astronotus ocellatus* (Perciformes, cichlidae), an ornamental and food fish in Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(3), 2305-2315.

Tops, S., Curry, A., Okamura, B. (2005). Diversity and systematics of the Malacosporea (Myxozoa). *Invertebrate Biology*, 124(4), 285-295.

Tundisi, J. G., Matsumura-Tundisi, T., Pereschi, D. C., Luzia, A. P., Haeling, P. H. V., Frollini, E. H. (2008). A bacia hidrográfica do Tietê/Jacaré: estudo de caso em pesquisa e gerenciamento. *Estudos Avançados*, 22(63).

Vávra, J., Lukeš, J. (2013). Microsporidia and 'the art of living together'. *Advances in Parasitology*, 82, 253-319.

Velasco, G. M., Rodero, M., Chivato, T., Cuellar, C. (2007). Seroprevalence of anti-*Kudoa* sp. (Myxosporea: Multivalvulida) antibodies in a Spanish population. *Parasitology Research*, 100, 1205-1211.

Velasco, M., Videira, M., Viana, J. M. S., Sanches, O., Santos, P. M., Carmona, S. S. C., Matos, E. (2015). Esophageal infection due to *Kudoa* sp. (Myxozoa) in mapara catfish, *Hypophthalmus marginatus*. *Aquaculture Reports*, 2, 22-25.

Velasco, M., Sindeaux-Neto, J. L., Videira, M., de Cássia S. N. L., Gonçalves, E. C., Matos, E. (2019). *Kudoa amazonica* n. sp. (Myxozoa; Multivalvulida), a parasite of the esophageal musculature of the freshwater catfish, *Hypophthalmus marginatus* (Siluriformes: Pimelodidae), from a river of the Amazon region. *Microbial Pathogenesis*, 130, 247-252.

Vidal, L., Iannacone, J., Whipps, C. M., Luque, J. L. (2017). Synopsis of the species of Myxozoa Grassé, 1970 (Cnidaria: Myxosporia) in the Americas. *Neotropical Helminthology*, 11(2), 413-511.

Vieira, D. H. M. D., Tagliavini, V. P., Abdallah, V. D., Azevedo, R. K. (2018). *Myxobolus imparfinis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporia), a new gill parasite of *Imparfinis mirini* Haseman (Siluriformes: Heptapteridae) in Brazil. *Systematic Parasitology*, 95(2-3), 309-318.

Vieira, D. H. M. D., Rangel, L. F., Tagliavini, V. P.; Abdallah, V. D., Santos, M. J., Azevedo, R. K. (2020). A new species, *Henneguya lacustris* n. sp. (Cnidaria: Myxosporia), infecting the gills of *Astyanax lacustris* from Brazil. *Parasitology Research*, 119(12), 4259-4265.

Vossbrinck, C. R., Debrunner-Vossbrinck, B. A. (2005). Molecular phylogeny of the Microsporidia: Ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia Parasitologica*, 52(1-2), 131-142.

Votýpka, J., Modrý, D., Obomik, M., Šlapeta, J., Lukeš, J. (2016). Apicomplexa. Cham: Springer International Publishing.

Wang, Q., Zhang, Y. S., Peng, Q. L., Wen, B., Gao, J. Z., Chen, Z. Z. (2022). Distinct skin morphological and transcriptomic profiles between wild and albino Oscar *Astronotus ocellatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 41, 100944.

Weiss, L. M., Vossbrinck, C. R. (1998). Microsporidiosis: molecular and diagnostic aspects. *Advances in Parasitology*, 40, 351-395.

Weiss, L. M., Edlind, T. D., Vossbrinck, C. R., Hashimoto, T. (1999). Microsporidian molecular phylogeny: the fungal connection. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46, 17S-18S.

Wharton, D. A. (1999). Parasites and low temperatures. *Parasitology*, 119, S7-S17.

Whipps, C. M., Gossel, G., Adlard, R. D., Yokoyama, H., Bryant, M. S., Munday, B. L., Kent, L. (2004). Phylogeny of multivalvulidae (Myxozoa: Myxosporia) based on comparative ribosomal DNA sequence analysis. *The Journal of Parasitology*, 90(3), 618-622.

Whipps, C. M., Fournie, J. W., Morrison, D. A., Azevedo, C., Matos, E., Thebo, P., Kent, M. L. (2012). Phylogeny of fish-infecting *Calyptospora* species (Apicomplexa: Eimeriorina). *Parasitology Research*, 111(3), 1331-1342.

Wolf, K., Markiw, M. E. (1984). Biology Contravenes Taxonomy in the Myxozoa: New Discoveries Show Alteration of Invertebrate and Vertebrate Hosts. *Science*, 225(4669), 1449-1452.

Woo, P. T. K. (2006). Fish Diseases and Disorders. In: *Protozoan and Metazoan Infections*. UK: CAB International, p. 791.

Xavier, R., Severino, R., Pérez-Losada, M., Gestal, C., Freitas, R., Harris, D. J., Veríssimo, A., Rosado, D., Cable, J. (2018). Phylogenetic analysis of apicomplexan parasites infecting commercially valuable species from the North-East Atlantic reveals high levels of diversity and insights into the evolution of the group. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1-12.

Xu, Y., Weiss, L. M. (2005). The microsporidian polar tube: A highly specialised invasion organelle. *International Journal for Parasitology*, 35(9), 941-953.

Yasuda, H., Ooyama, T., Iwata, K., Tun, T., Yokoyama, H., Ogawa, K. (2002). Fish-to-fish transmission of *Myxidium* spp. (Myxozoa) in cultured tiger puffer suffering from emaciation disease. *Fish Pathology*, 37, 29-33.

5. Capítulo I

Coccidiose hepática causada por *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* (Apicomplexa: Calyptosporidae) em *Serrasalmus maculatus* coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil

Resumo

Espécies do gênero *Calyptospora* pertencem aos parasitos coccídeos de peixes, um grupo que ainda tem que ser explorado principalmente no sudeste do Brasil, já que a maioria das espécies conhecidas pertencem aos peixes da região nordeste do Brasil. *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* estava parasitando o tecido hepático do peixe *Serrasalmus maculatus* proveniente do rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. Fornecemos um complexo de informações morfológicas, moleculares e filogenéticas baseado no gene *ssrDNA*. *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* apresenta oocistos esféricos medindo em média $19,9 \pm 1,2$ (18,0-22,0) μm de diâmetro, contendo quatro esporocistos piriformes medindo $8,7 \pm 0,7$ (6,6-10,3) μm de comprimento e $4,8 \pm 0,5$ (3,3-6,4) μm de largura e membrana adesiva fina ao redor de cada esporocisto. Na análise histopatológica é possível observar que *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* estava causando coccidiose hepática no hospedeiro e na análise filogenética *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* está agrupada como espécie irmã de *C. gonzaguensis*, mostrando pouca diferença genética (1,9%).

Palavras-chave: Fígado, filogenia, histologia, molecular, morfologia, *ssrDNA*, ultraestrutural.

Abstract

Species of the genus *Calyptospora* belong to the coccidian parasites of fish, a group that has yet to be explored mainly in southeastern Brazil, since most of the known species belong to fish from the northeastern region of Brazil. *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* was parasitizing the liver tissue of the fish *Serrasalmus maculatus* from the Jacaré-Guaçu River, municipality of Ibitinga, São Paulo state, Brazil. We provide a complex of morphological, molecular and phylogenetic information based on the *ssrDNA* gene. *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* has spherical oocysts measuring on average 19.9 ± 1.2 (18.0-22.0) μm in diameter, containing four pyriform sporocysts measuring 8.7 ± 0.7 (6.6-10.3) μm in length and 4.8 ± 0.5 (3.3-6.4) μm in width and thin adhesive membrane surrounding each sporocyst. In histopathological analysis it can be observed that *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* was causing hepatic coccidiosis in the host and in phylogenetic analysis *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* is grouped as sister species of *C. gonzaguensis*, showing little genetic difference (1.9%).

Keywords: Histology, liver, molecular, morphology, phylogeny, *ssrDNA*, ultrastructural.

1. Introdução

Coccídeos são conhecidos por serem parasitos de diferentes órgãos e diferentes grupos de animais vertebrados, parasitando principalmente peixes, anfíbios, mamíferos, aves e répteis (Dyková e Lom, 1981; Morrison e Hawkins, 1984; Azevedo et al., 1993; Whipps et al., 2012). Coccídeos que parasitam peixes de água doce e marinhos englobam os gêneros *Eimeria* Schneider, 1875, *Crystallospora* Labbé, 1896, *Goussia* Labbé, 1896, *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 e *Calyptospora* Overstreet, Hawkins e Fournie, 1984 (Dyková e Lom, 1981; Lom e Dyková, 1992; Molnár, 2006).

Anteriormente, as espécies que agora fazem parte do gênero *Calyptospora* eram descritas como membros do gênero *Eimeria* mesmo tendo algumas diferenças morfológicas. Overstreet et al. (1984) descreveram o gênero *Calyptospora* e inseriram na família Calyptosporidae Overstreet, Hawkins e Fournie, 1984, permanecendo no grupo Coccidia do filo Apicomplexa Levine, 1970. Os caliptosporídeos são protozoários microparasitos que infectam peixes de água doce e marinhos como hospedeiros definitivos e provavelmente invertebrados aquáticos como hospedeiros intermediários, para que a transmissão ocorra e complete o ciclo de vida (Overstreet et al., 1984).

Até o momento, foram descritas sete espécies do gênero *Calyptospora*, parasitando peixes de diferentes regiões geográficas: *C. funduli* Duszynski, Solangi e Overstreet, 1979 (*Fundulus grandis* Baird e Girard, 1853, EUA), *C. empristica* Fournie, Hawkins e Overstreet, 1985 (*Fundulus notti* Fournie, 1985, EUA), *C. serrasalmi* Cheung, Nigrelli e Ruggieri, 1986 (*Serrasalmus niger* Jardine 1841, Brasil), *C. tucunarensis* Békési e Molnár, 1991 (*Cichla ocellaris* Bloch e Schneider, 1801, Brasil), *C. spinosa* Azevedo e Matos, 1993 (*Crenicichla lepidota* Heckel, 1840, Brasil), *C. paranaidji* Silva, Silva, Giese, Hamoy e Matos, 2018 (*Cichla piquiti* Kullander e Ferreira, 2006, Brasil) e *C. gonzaguensis* Silva, Orlanda, Araújo-Costa, Hamoy e Matos, 2020 (*Triporthus angulatus* (Spix e Agassiz, 1829), Brasil), além de relatos de *Calyptospora* sp. parasitando outros peixes (Bonar et al., 2006; Albuquerque e Brasil-Sato, 2010; Santiago et al., 2012; Silva et al., 2012; Videira et al., 2013 e Oliveira et al., 2021).

Serrasalmus maculatus Kner, 1858 (Serrasalmidae: Characiformes) está distribuído na América do Sul. Esta espécie é conhecida popularmente como "piranha amarela" com grande importância comercial e econômica (Jégu, 2003). Como características comportamentais é ativa durante o dia e tem hábito alimentar onívoro,

alimentando-se de insetos, crustáceos e restos de peixe (Sazima e Zamprogno, 1985; Silva et al., 2015).

Considerando as poucas espécies do gênero *Calyptospora* que foram descritas no Brasil e no mundo, este estudo tem como objetivo descrever *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* que estava parasitando o tecido hepático de *S. maculatus* coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil, a partir do conjunto de dados morfológicos, moleculares com base no gene da subunidade ribossomal pequena - ssrDNA e filogenéticos.

2. Material e métodos

2.1. Coleta do hospedeiro e parasito

Entre abril e agosto de 2018, 11 espécimes de *S. maculatus* foram coletados no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, São Paulo, Brasil (21°50'10.0"S 48°54'53.6"W). Os peixes foram anestesiados utilizando Eugenol (óleo de cravo) e sacrificados por secção da medula espinhal sob autorização da “Comissão de Ética no Uso de Animais” (CEUA nº 1109) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu. Após, os peixes foram enviados ao Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (LAPAS), localizado na UNESP e mantidos em freezer até o momento da necropsia.

Todos os órgãos dos peixes foram analisados sob estereomicroscópio (BEL Photonics) para verificar a presença de plasmódios. Plasmódios presentes no tecido hepático do hospedeiro foram inseridos entre lâmina e lamínula, prensados manualmente, e visualizados sob microscópio de luz convencional (Leica Microsystems) para identificação prévia do parasito.

2.2. Análise morfológica

As características morfológicas foram analisadas usando microscópio de luz com contraste de interferência diferencial (DIC) (Leica DMLB 5000, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) com ampliação de 1000×. As imagens obtidas foram utilizadas para análise morfométrica e o diâmetro dos oocistos maduros (n= 30) e comprimento e largura

dos esporocistos foram obtidos em micrometros (μm) utilizando o software LAS v. 3.8 (Leica Microsystems).

Fragmento do tecido hepático contendo plasmódios foram fixados em glutaraldeído para análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET). As etapas de processamento após a fixação consistiram em lavagem das amostras por três vezes durante cinco minutos em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,3. As amostras foram imersas em tetróxido de ósmio por duas horas e após foram realizadas três lavagens com intervalos de 10 minutos em água destilada. Em seguida, as amostras foram imersas em acetato de uranila 0,5% em água destilada por duas horas, desidratadas em série crescente de acetona, fixadas em resina Araldite™ 1:1 + 100% Acetona por 12 horas à temperatura ambiente e inseridas em resina por uma hora em estufa a 37°C. As amostras foram aparadas para a realização dos cortes semifinos e ultrafinos e após foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e visualizadas sob MET (Tecnai™ Spirit TEM) no Centro de Microscopia Eletrônica (CME), Instituto de Biociências (IBB), UNESP, Botucatu.

Para análise histológica, pequenos fragmentos do fígado parasitado foram fixados em formaldeído a 10%. Após essa etapa, a amostra foi lavada em água corrente e submetida ao processo de desidratação em série gradativa de etanol e fixada em xilol e incluída na parafina. Secções histológicas com 6 μm de espessura foram coradas com hematoxilina-eosina e observadas sob microscópio de luz.

2.3. Análise molecular

Para a análise molecular, plasmódios coletados do tecido hepático foram fixados em etanol absoluto (Merck®) e posteriormente o ácido desoxirribonucleico (DNA) foi extraído usando o kit DNeasy® Blood e Tissue (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante correspondente a extração de DNA de tecido animal. Fragmento do gene *ssrDNA* obtido foram amplificados usando dois conjuntos de primers, 18E pareado com ERIB10 (Hillis e Dixon, 1991; Barta et al., 1997) e ERIB1 pareado com Coc2R (Barta et al., 1997; Whipps et al., 2012) por reações em cadeia de polimerase (PCR), no qual consistiu em volume final de 50 μl , contendo 25 μl de 2X PCR Taq MasterMix, 3 μl de extração de DNA da amostra, 1 μl de primer forward, 1 μl de primer reverse e 20 μl de água destilada, seguindo as condições da PCR, com desnaturação inicial de 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C por 1 min, anelamento por 55°C por 45 s,

72°C por 2 min e extensão final de 72°C por 7 min utilizando o termociclador Bio-Rad MJ Mini Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories PA, EUA).

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR foram clonados em TOPO TA Cloning vector (Invitrogen®), utilizado para a transformação de células competentes de *Escherichia coli* (Escherich, 1885) dH10β. As células foram transformadas e diretamente transferidas para uma placa com meio de ágar LB com 100 µg/mL de ampicilina e mantidas a 37°C durante 12 horas. Os clones foram amplificados em meio líquido LB durante 12 horas adicionais a 37°C a 200 rpm. Finalmente, as pastilhas foram purificadas com Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega®).

As sequências parciais disponíveis para análise foram montadas e editadas pelo software Geneious 7.1.3 (Kearse et al., 2012). A sequência consenso gerada foi analisada usando “Basic Local Alignment Search Tool” (BLASTn) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) para verificar a similaridade com outras sequências ssrDNA de espécies de coccídeos disponíveis no banco de dados GenBank. Portanto, a sequência alvo com 19 outras espécies de coccídeos parasitos com similaridade genética > 80% e *Adelina grylli* Butaeva, 1996 (DQ096836) usada como grupo externo foram alinhadas usando o algoritmo MUSCLE e configurações padrões do software Geneious 7.1.3.

As análises filogenéticas foram geradas pelos métodos de inferência Bayesiana (IB) e “maximum likelihood” (ML). O método IB foi executado pelo software MrBayes on XSEDE 3.2.7a (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) usando o algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC) com 10 milhões de gerações e duas corridas. O modelo evolutivo GTR+G+I foi selecionado por jModeltest 2.1.10 (Darriba et al., 2012) com base no critério de informação Akaike (AIC). O burn-in foi de 30% e a convergência dos resultados filogenéticos foi analisada pelo software Tracer 1.7.2 (Rambaut et al., 2018).

O método ML foi gerado pelo software RAxML-HPC v.8 on XSEDE 8.2.12 (Stamatakis, 2014) usando bootstrap com 1000 replicações para estimar os nós internos da árvore. As análises correspondentes ao MrBayes e RAxML foram geradas pelo servidor CIPRES (Miller et al., 2010). As árvores geradas foram analisadas pelo FigTree 1.4.4 (Rambaut, 2014) e editadas pelo Adobe Illustrator 24.0.

3. Resultados

A análise parasitológica mostrou que entre os 11 espécimes de *S. maculatus* analisados, apenas um espécime estava com o tecido hepático parasitado com *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis*. Dentro de cada plasmódio haviam oocistos maduros e imaturos, representando um desenvolvimento assíncrono do parasito.

3.1. Resumo taxonômico

Filo Apicomplexa Levine, 1970

Classe Coccidia Leuckart, 1879

Ordem Eucoccidiorida Leger e Duboscq, 1910

Subordem Eimeriorina Leger, 1911

Família Calyptosporidae Overstreet, Hawkins e Fournie, 1984

Gênero *Calyptospora* Overstreet, Hawkins e Fournie, 1984

Calyptospora cf. *C. gonzaguensis* (**Figura 1 A-B**).

Hospedeiro-tipo: *Serrasalmus maculatus* (Serrasalmidae, Characiformes).

Prevalência: 1 de 11 (9,1%) peixes analisados estavam infectados.

Abundância: >100 plasmódios parasitando o tecido hepático do hospedeiro.

Localidade-tipo: rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil (21°50'10.0"S 48°54'53.6"W).

Órgão infectado: tecido hepático.

Morfologia: oocistos esféricos maduros com média de $19,9 \pm 1,2$ (18,0-22,0) μm de diâmetro e quatro esporocistos piriformes com $8,7 \pm 0,7$ (6,6-10,3) μm de comprimento e $4,8 \pm 0,5$ (3,3-6,4) μm de largura, envoltos individualmente por membrana adesiva fina, compostos por extensão posterior com comprimento médio de 2,4 μm . Os esporópodes estão presentes desde a extremidade da superfície do corpo até a extensão posterior.

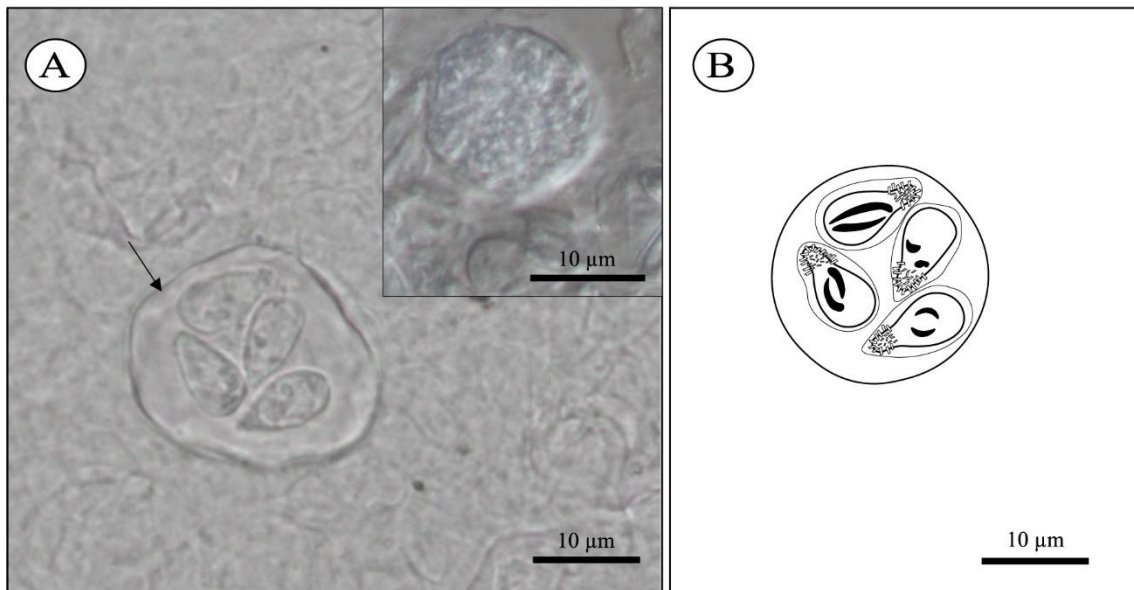


Figura 1. *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* parasitando o tecido hepático de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 proveniente do rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Oocisto maduro (seta) de *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* contendo quatro esporocistos. Em destaque, oocisto imaturo (*). **B.** Ilustração esquemática do oocisto maduro.

3.2. Comentários

Calyptospora cf. *C. gonzaguensis* foi morfologicamente comparada com outras espécies de *Calyptospora* previamente descritas em peixes dos Estados Unidos e do Brasil e possui morfologia semelhante às espécies já descritas (**Tabela 1**). *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* tem maior similaridade morfométrica com *C. gonzaguensis*, mostrando pouca diferença na largura dos esporocistos (4,8 µm vs 3,9 µm).

Calyptospora cf. *C. gonzaguensis* e *C. serrasalmi* foram encontradas parasitando espécies de peixes do gênero *Serrasalmus* (*S. maculatus* vs *S. niger*, *S. striolatus* (Steindachner, 1908) e *S. rhombeus* (Linnaeus, 1766), respectivamente), mas *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* e *C. serrasalmi* exibem medidas diferentes em todas as características morfológicas e *C. serrasalmi* tem medidas maiores tanto dos oocistos como dos esporocistos, indicando serem espécies distintas. Em relação as demais espécies de *Calyptospora*: *C. paranaidji*, *C. tucunarensis*, *C. spinosa*, *C. funduli* e *C. empristica* apresentam os oocistos maiores do que *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis*.

Tabela 1. Dados morfométricos de oocistos e esporocistos de *Calyptospora* spp. coletadas em peixes do Brasil e Estados Unidos das Américas (EUA). Oocisto (O), comprimento do esporocisto (CE), largura do esporocisto (LE), extensão posterior (EP), Informação ausente (-). Os valores estão representados em micrômetros (µm) e estão expressados por média ± desvio padrão. O intervalo dos valores mínimo e máximo estão entre parênteses.

Espécies	Hospedeiros	O	CE	LE	EP	Órgãos infectados	Localidades geográficas	Referências
<i>Calyptospora</i> cf. <i>C. gonzaguensis</i>	<i>Serrasalmus maculatus</i> Kner, 1858	19,9±1,2 (18,0-22,0)	8,7±0,7 (6,6-10,3)	4,8±0,5 (3,3-6,4)	2,2±0,1	Fígado	São Paulo/Brasil	Presente estudo
<i>C. gonzaguensis</i> Silva, Orlanda, Araújo-Costa, Hamoy e Matos, 2020	<i>Triportheus angulatus</i> (Spix e Agassiz, 1829)	19,6±1,4	9,2±0,6	3,9±0,2	2,2±0,4	Fígado, vesícula biliar e tecido adiposo	Maranhão/Brasil	Silva et al. (2020)
<i>C. paranaidji</i> Silva, Silva, Giese, Hamoy e Matos, 2018	<i>Cichla piquiti</i> Kullander e Ferreira, 2006	22,1±1,5	9,7±0,5	4,6±0,6	2,1±0,2	Fígado	Maranhão/Brasil	Silva et al. (2018)
<i>C. serrasalmi</i> Cheung, Nigrelli e Ruggieri, 1986	<i>Serrasalmus niger</i> (Jardine e Schomburgk, 1841)	23,8 (22,0-25,0)	11,0 (10,0-11,5)	5,7 (5,0-6,0)	-	Fígado	Amazonas e Pernambuco/Brasil	Cheung et al. (1986)

<i>C. serrasalmi</i>	<i>Serrasalmus striolatus</i> (Steindachner, 1908) e <i>S. rhombeus</i> (Linnaeus, 1766)	25,4	11,7	5,9	0,5	Fígado	Pará/Brasil	Casal et al. (2007)
<i>C. tucunarensis</i> Békési e Molnár, 1991	<i>Cichla ocellaris</i> Bloch e Schneider, 1801	24,3 (23,0-26,0)	8,3 (7,2-9,1)	3,7 (3,5-5,0)	2,7 (2,5-2,9)	Fígado	Ceará/Brasil	Békési e Molnár (1991)
<i>C. spinosa</i> Azevedo e Matos, 1993	<i>Crenicichla lepidota</i> Heckel, 1840	21,1-23,4	9,3 (8,9-9,5)	3,8 (3,6-4,1)	2,2	Fígado e gônadas	Pará/Brasil	Azevedo et al. (1993)
<i>Calyptospora</i> sp. 1	<i>Arapaima gigas</i> (Schinz, 1823)	19,0 (16,0-22,0)	9,0 (8,0-10,0)	4,0 (4,0-5,0)	0,5	Fígado	Brasil	Bonar et al. (2006)
<i>Calyptospora</i> sp. 2	<i>Triportheus guentheri</i> (Garman, 1890) e <i>Tetragonopterus chalceus</i> Spix e Agassiz, 1829	24,5	11,5	4,5	-	Fígado e intestino	Minas Gerais/Brasil	Albuquerque e Brasil-Sato (2010)
<i>Calyptospora</i> sp. 3	<i>Brachyoplatystoma vaillantii</i> (Valenciennes, 1840)	20,8	8,9	4,1	-	Fígado	Pará/Brasil	Silva et al. (2012)
<i>Calyptospora</i> sp. 4	<i>Cichla temensis</i> Humboldt, 1821	21,2	9,2	3,1	-	Fígado	Pará/Brasil	Santiago et al. (2012)

<i>Calyptospora</i> sp. 5	<i>S. rhombeus</i> (Linnaeus, 1766)	17,4±1,0 (15,7-19,0)	8,3±1,1 (6,0-10,0)	4,3±0,8 (3,0-4,7)	-	Fígado	Pará/Brasil	Oliveira et al. (2021)
<i>C. funduli</i> Duszynski, Solangi e Overstreet, 1979	<i>Fundulus grandis</i> Baird e Girard, 1853	24,5 (20,0-31,0)	10,0 (9,0-11,0)	6,0 (5,0-7,0)	2,0 (1,0-3,0)	Fígado	EUA	Duszynski et al. (1979)
<i>C. funduli</i>	<i>Opsanus beta</i> (Goode e Bean, 1880)	20,0	9,0	3,0	1,0	Fígado	EUA	Oliveira et al. (1993)
<i>C. empristica</i> Fournie, 1985	<i>Fundulus notti</i> Fournie, 1985	22,3 (19,6-24,5)	9,0 (7,0-9,5)	5,4 (4,5-7,5)	5,7 (5,0-7,0)	Fígado	EUA	Fournie (1985)

3.3. Análises ultraestrutural e histológica

Na análise ultraestrutural é possível verificar que os quatro esporocistos têm dois esporozoítos contraídos, indicando degeneração e em cada esporocisto há membrana ao redor (**Figura 2A**). Na porção pontiaguda da extremidade posterior há esporópodes auxiliando na sustentação da membrana (**Figura 2B**). Observamos também a presença de uma abertura apical na extremidade anterior e ausência de corpos stieda e sub-stieda na extremidade posterior, nos quais são características que diferenciam os caliptosporídeos dos parasitos eimerianos.

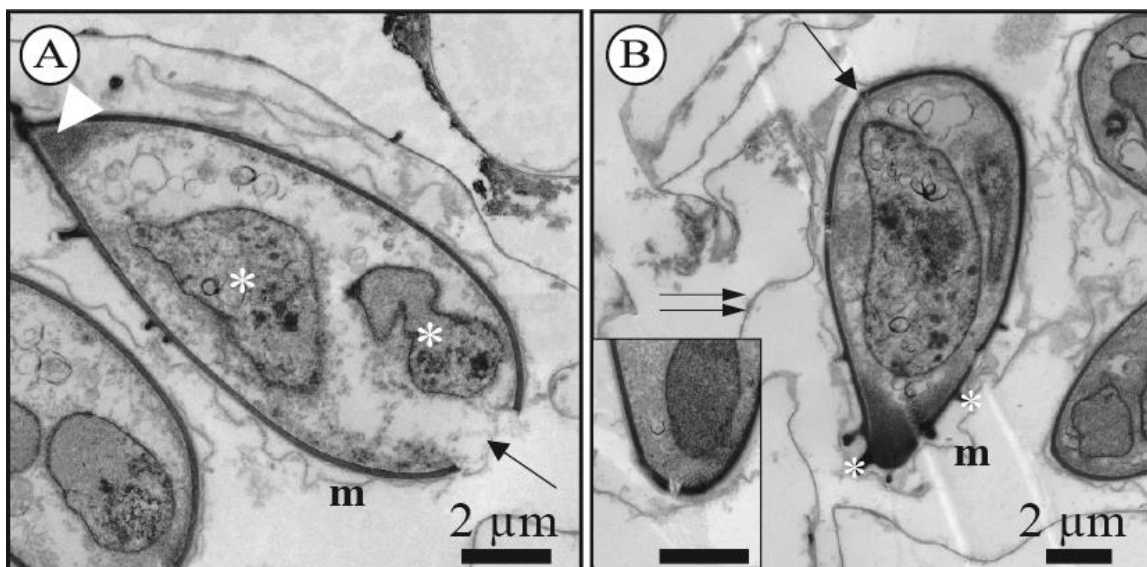


Figura 2. Análise ultraestrutural de *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* encontrada parasitando o tecido hepático de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 proveniente do rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Corte longitudinal do esporocisto destacando a abertura anterior coberta pela membrana (m), espessamento posterior (ponta de seta), esporozoítos contraídos (*) com restos do corpo residual. **B.** Corte longitudinal do esporocisto mostrando esporópodes na extremidade posterior (*), parede do oocisto (setas duplas), membrana ao redor dos esporocistos (m), esporocisto sem sutura e presença de papilas, região onde a sutura é fundida (seta). Destaque do esporocisto com abertura apical. Barra de escala: 2 μm.

Na análise macroscópica observamos o tecido hepático do hospedeiro com plasmódios esbranquiçados aderente ao tecido hepático (**Figura 3**).

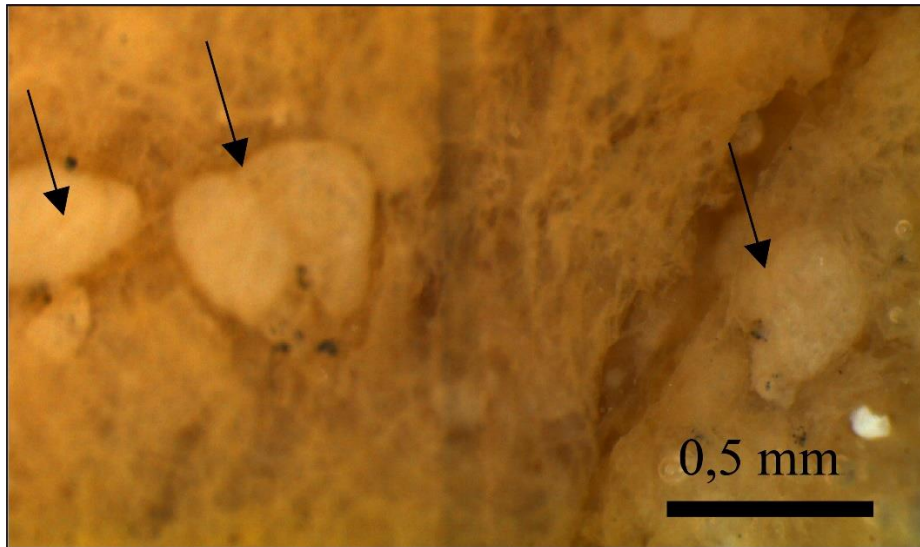


Figura 3. Imagem macroscópica do tecido hepático de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 coletado do rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil mostra vários plasmódios (setas) contendo *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis*.

A análise histopatológica do tecido hepático de *S. maculatus* mostra a formação de vários agregados de oocistos de *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* (**Figura 4A**) causando coccidiose no tecido hepático do hospedeiro. O parasito desenvolveu degeneração evidente do tecido hepático devido à alta intensidade da infecção. É possível observar a dissociação da estrutura normal do tecido hepático, indicando necrose dos hepatócitos. Conseqüentemente, podemos observar que a necrose desenvolveu dilatação dos sinusoides (**Figura 4B**), indicados pelos espaços vazios no tecido hepático.

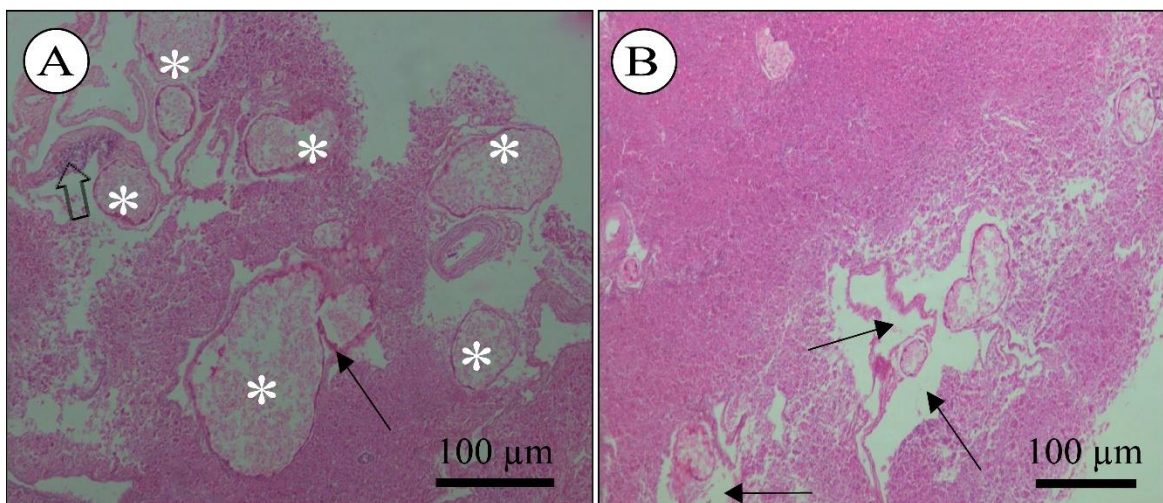


Figura 4. Imagem histológica do tecido hepático do *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil

parasitado com *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis*. **A.** Agregados de oocistos de *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* (*) rodeados por tecido conjuntivo (seta) e infiltrados inflamatórios (seta aberta). **B.** Necrose do tecido hepático com dilatação sinusoidal (setas). **A-B.** Coloração de hematoxilina-eosina.

Os nódulos fibróticos são observados em torno dos hepatócitos que tiveram necrose (**Figura 5A**) e podemos observar que junto à fibrose ocorre o desenvolvimento de granuloma (**Figura 5B**). A formação de granulomas, presença de infiltrados inflamatórios e centros melanomacrofágicos (**Figura 5C**) podem estar relacionados com o processo inflamatório causado pelo parasito. Também, na análise histopatológica, é possível observar a proliferação de ductos biliares (**Figura 5D**) o que pode estar indicando um processo de regeneração do tecido hepático do hospedeiro.

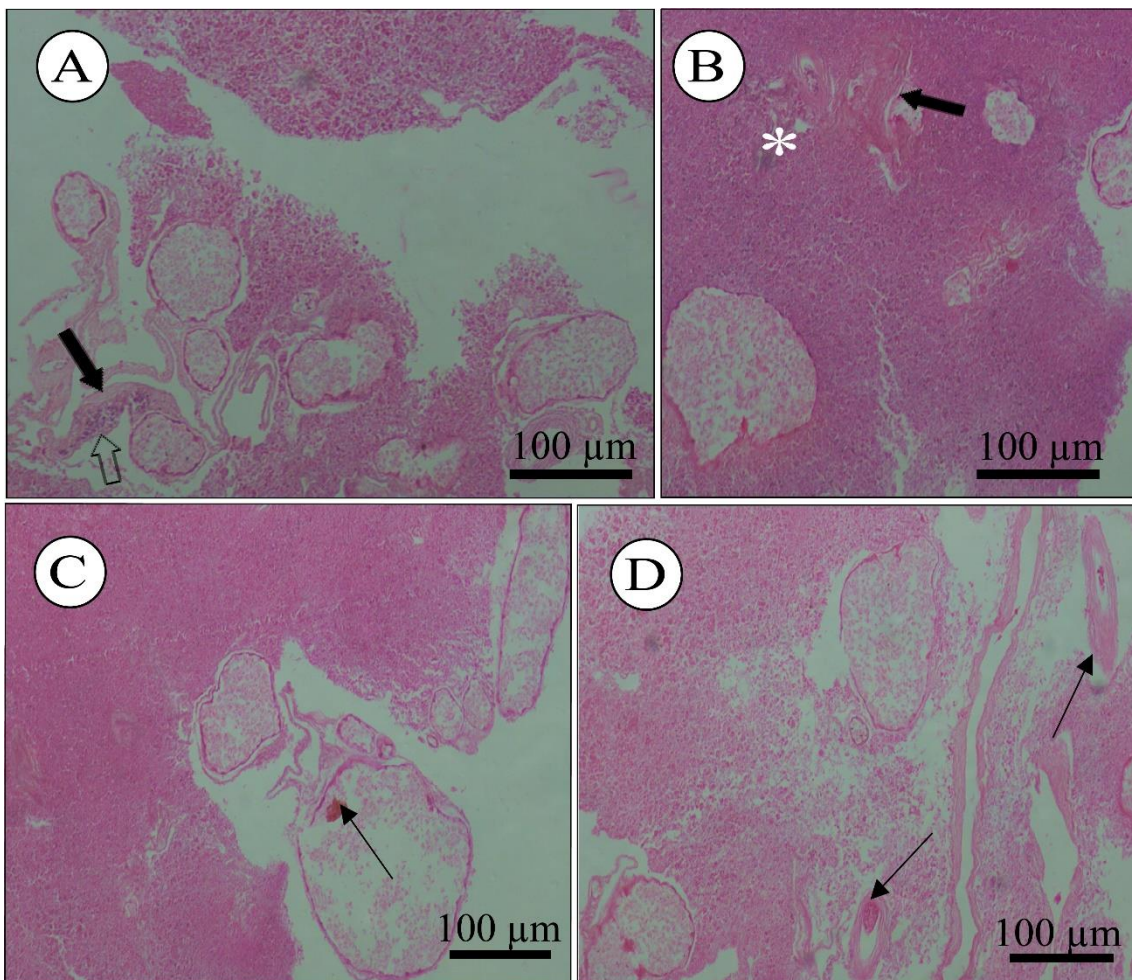


Figura 5. Imagem histológica do tecido hepático do *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil

intensamente parasitado com *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis*. **A.** Nódulos fibróticos (seta) juntos com infiltrados inflamatórios (seta aberta). **B.** Fibrose (seta) e formação de granuloma (*). **C.** Centros melanomacrofágicos (seta) ao redor dos oocistos. **D.** Proliferação ductal (seta). **A-D.** Coloração de hematoxilina-eosina.

3.4. Análise molecular e filogenética

A sequência parcial do gene *ssrDNA* de *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* tem 849 pb e ao ser pesquisada no BLAST para comparação com outras espécies de coccídeos disponíveis no GenBank tem maior semelhança genética com *C. gonzaguensis* (MN704279) mostrando 98,1% de similaridade e 100% de cobertura. As análises filogenéticas são bem suportadas e *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* corresponde ser espécie irmã de *C. gonzaguensis*, caliptosporídeo também do tecido hepático do peixe pertencente a ordem Characiformes. A análise IB gerou a árvore filogenética (**Figura 6**) com dois principais clados (A-B), no qual, o clado A está composto exclusivamente por espécies de coccídeos do gênero *Eimeria* que parasitam mamíferos, répteis e aves, enquanto que clado B está composto por dois subclados (B1-B2) pertencentes exclusivamente por parasitos coccídeos de peixes, sendo que no subclado B2 incluem as espécies do gênero *Calyptospora*, parasitos extraintestinais de peixes. A mesma topologia da árvore filogenética foi gerada para a análise por ML.

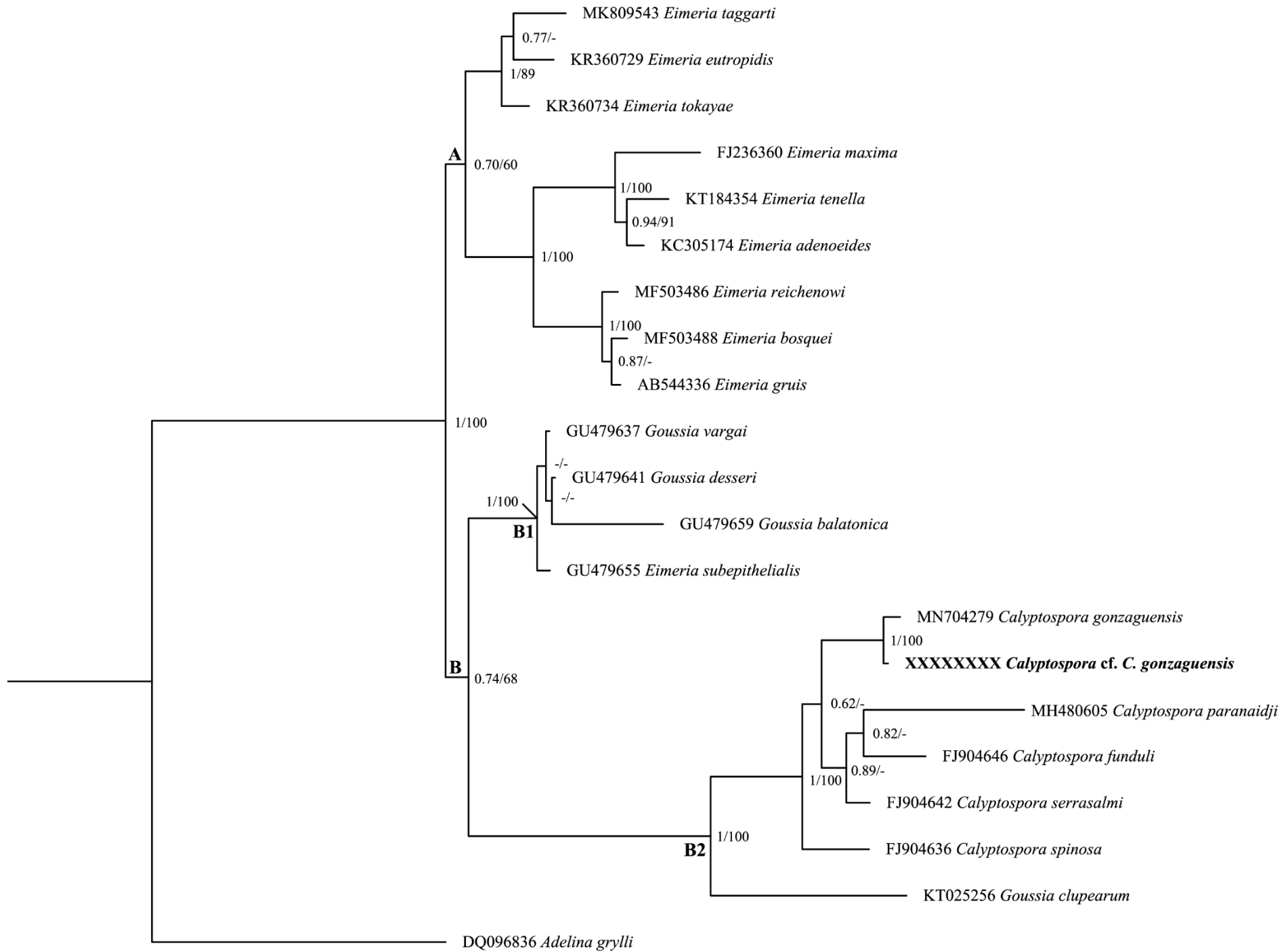


Figura 6. Árvore filogenética obtida pela análise por inferência Bayesiana com as seqüências ssrDNA de parasitos coccídeos, *Adelina grylli* Butaeva, 1996 foi usada como outgroup. Os valores dos nós são representados pelo suporte de probabilidade posterior/bootstrap. Os valores abaixo de 0.60 e 60 são indicados por traços (-). Os números de acesso GenBank são mostrados antes do nome de cada espécie.

4. Discussão

As análises morfológicas auxiliaram para diferenciação de *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* com os outros grupos de parasitos coccídeos de peixes, principalmente devido à presença de esporópodes e ausência dos corpos de stieda e sub-stieda nos esporocistos (Whipps et al., 2012). Foi observado uma baixa prevalência de infecção em *S. maculatus* por *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis*, sendo similar com a prevalência observada no hospedeiro *T. angulatus* por *C. gonzaguensis* (Silva et al., 2020).

Estudos anteriores relatam que a baixa prevalência de infecção pode estar relacionada com o hábito alimentar dos peixes (Silva et al., 2020) e infecções anteriores por espécies de *Calyptospora* em peixes com hábitos onívoros e carnívoros mostram uma alta prevalência de infecção. No entanto, neste estudo não observamos as mesmas hipóteses, uma vez que *S. maculatus* é onívoro e a infecção mostrou baixa prevalência. Portanto, devido às barreiras que limitam a infecção causada por coccídeos, inferimos a hipótese de que a ausência do hospedeiro invertebrado no ambiente aquático está relacionada com a baixa prevalência de infecção por *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis*.

Overstreet et al. (1984) relataram que a família Calyptosporidae possui organismos com características mais primitivas, como infecção extraintestinal em comparação com espécies das famílias Sarcocystidae, Eimeriidae e Lankesterellidae que causam infecções no intestino de peixes e também porque os parasitos caliptosporídeos possuem dois hospedeiros para completar o ciclo de vida. Da mesma forma, a presença de corpos stieda e sub-stieda são características mais derivadas e estão ausentes em caliptosporídeos (Overstreet et al., 1984).

Existem poucas informações sobre as doenças causadas pelas espécies de *Calyptospora* em peixes. No entanto, alguns estudos descrevem tais eventos (Solangi e Overstreet, 1980; Cheung et al., 1986; Békési e Molnár, 1991; Azevedo et al., 1993; Fournie e Overstreet, 1993; Silva et al., 2018, Silva et al., 2020; Oliveira et al., 2021). Na infecção causada por *C. funduli*, os oocistos isolados e agregados ocupavam cerca de 85%

do tecido hepático dos peixes e foram separados por uma fina camada do tecido do hospedeiro, neste caso, o caliptosporídeo gerou lesões em todo o tecido hepático e desenvolveu infiltrados de células inflamatórias, cápsulas fibróticas, granuloma e centros necróticos (Solangi e Overstreet, 1980; Fournie e Overstreet, 1993).

Calyptospora serrasalmi também desenvolveu lesões no tecido hepático, formação de granuloma e os oocistos estavam rodeados pelo tecido conjuntivo do hospedeiro, assim como na infecção causada por *C. empristica* (Fournie, 1985; Cheung et al., 1986). As lesões e inflamações causadas por *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* em *S. maculatus* foram semelhantes pelas infecções por *C. funduli*, *C. serrasalmi* e *C. empristica* nos peixes hospedeiros.

Calyptospora tucunarensis gerou lesões graves no tecido hepático do hospedeiro, com ausência de inflamação e necrose (Békési e Molnár, 1991), diferenciando do presente estudo, pois a coccidiose desenvolvida por *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* gerou necrose hepática e presença de células inflamatórias. *Calyptospora spinosa* causou alterações celulares no tecido hepático de *C. lepidota*, tais como hipertrofia e destruição citoplasmática (Azevedo et al., 1993). *Calyptospora paranaidji* e *C. gonzaguensis* desenvolveram centros melanomacrofágicos em torno dos oocistos, indicando um processo inflamatório no tecido hepático dos peixes (Silva et al., 2018; Silva et al., 2020). Na infecção causada por *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* em *S. maculatus* neste presente estudo observamos que o fígado também estava com este tipo de inflamação, no qual, tais aspectos são comuns em infecções graves do tecido hepático dos peixes causadas por caliptosporídeos.

Em alguns estudos histopatológicos, pode-se observar que espécies de *Calyptospora* não geraram inflamações nos tecidos hepáticos dos peixes analisados (Bonar et al., 2006; Santiago et al., 2012; Ramos et al., 2018), enquanto que em outros estudos pode-se observar degeneração hepática, fibrose e necrose, bem como alterações celulares hepáticas, presença de infiltrados de células mononucleares e melanomacrofágicos próximos aos oocistos, indicando reação inflamatória (Videira et al., 2013; Oliveira et al., 2021).

A análise filogenética mostra que *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* está no subclado (B2) composto por outras espécies de *Calyptospora* juntamente com *Goussia clupearum* (Thélohan, 1894), no qual são espécies que parasitam o tecido hepático de peixes, separando-os das outras espécies de *Goussia* que são responsáveis por causar infecção intestinal nos peixes. Estes resultados corroboram com outros estudos

filogenéticos realizados com as espécies de *Calyptospora* (Whipps et al., 2012; Silva et al., 2018, Silva et al., 2020) mostrando que as espécies deste gênero são filogeneticamente próximas de outros coccídeos parasitos, principalmente das espécies correspondentes aos gêneros *Eimeria* e *Goussia*.

5. Referências

- Albuquerque, M. C., Brasil-Sato, M. C. (2010). First report of *Calyptospora* sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) in forage characid fish from the Três Marias Reservoir, São Francisco Basin, Brazil. *European Journal of Protistology*, 46(2), 150-152.
- Azevedo, C., Matos, P., Matos, E. (1993). Morphological data of *Calyptospora spinosa* n. sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) parasite of *Crenicichla lepidota* HECKEL, 1840 (Teleostei) from Amazon river. *European Journal of Protistology*, 29(2), 171-175.
- Barta, J. R., Martin, D. S., Liberator, P. A., Dashkevich, M., Anderson, J. W., Feighner, S. D., Elbrecht, A., Perkins-Barrow, A., Jenkins, M. C., Danforth, H. D. (1997). Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *Journal for Parasitology*, 83, 262-271.
- Békési, L., Molnár, K. (1991). *Calyptospora tucunarensis* n. sp. (Apicomplexa: Sporozoea) from the liver of tucunare *Cichla ocellaris* in Brazil. *Systematic Parasitology*, 18(2), 127-132.
- Bonar, C. J., Poynton, S. L., Schulman, F. Y., Rietcheck, R. L., Garner, M. M. (2006). Hepatic *Calyptospora* sp. (Apicomplexa) infection in a wild-born, aquarium-held clutch of juvenile arapaima *Arapaima gigas* (Osteoglossidae). *Diseases of Aquatic Organisms*, 70(1-2), 81-92.
- Casal, G., Padovan, I., Matos, E., Padovan, P., Matos, P., Guimarães, A., Azevedo, C. (2007). Morphological and ultrastructural redescription of *Calyptospora serrasalmi* Cheung, Nigrelli e Ruggieri, 1986 (Apicomplexa: Calyptosporidae), a parasite found in two new host species of the genus *Serrasalmus*. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 24, 11-16.
- Cheung, P. J., Nigrelli, R. F., Ruggieri, G. D. (1986). *Calyptospora serrasalmi* sp. nov. (Coccidia: Calyptosporidae) from liver of the black piranha, *Serrasalmus niger* Schomburgk. *Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences*, 4, 54-57.
- Darriba, D., Taboada, G., Doallo, R. et al. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.

- Duszynski, D. W., Solangi, M. A., Overstreet, R. M. (1979). A new and unusual eimerian (Protozoa: Eimeriidae) from the liver of the Gulf killifish, *Fundulus grandis*. *Journal of Wildlife Diseases*, 15(4), 543-552.
- Dyková, I., Lom, J. (1981). Fish coccidia: critical notes on life cycles, classification and pathogenicity. *Journal of Fish Diseases*, 4(6), 487-505.
- Fournie, J. W. (1985). *Calyptospora empristica* n. sp. (Eimeriorina: Calyptosporidae) from the Liver of the Starhead Topminnow, *Fundulus notti*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 32(3), 542-547.
- Fournie, J. W., Overstreet, R. M. (1993). Host specificity of *Calyptospora funduli* (Apicomplexa: Calyptosporidae) in atheriniform fishes. *The Journal of Parasitology*, 79(5), 720-727.
- Hillis, D. M., Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66, 411-453.
- Jégu, M. (2003). Subfamily Serrasalminae (Pacus and piranhas) In: Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris, C. J. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs, 182-196.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Lom, J., Dyková, I. (1992). Protozoan parasites of fishes. In: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Amsterdam: Elsevier, 26, 315 p.
- Miller, M., Pfeiffer, W. T., Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees. In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop*, 14, 1-8.
- Molnár, K. (2006). Phylum Apicomplexa. In: Woo, P. T. K. *Fish diseases and disorders: 1. Protozoan and metazoan infections*. pp. 183-204.
- Morrison, C. M., Hawkins, W. E. (1984). Coccidians in the liver and testis of the herring *Clupea harengus* L. *Canadian Journal of Zoology*, 62(3), 480-493.
- Oliveira, M., Hawkins, W., Overstreet, R., Fournie, J. (1993). *Calyptospora funduli* (Apicomplexa, Calyptosporidae) in the liver of the gulf toadfish, *Opsanus beta*. *Journal of the Helminthological Society of Washington*, 60(2), 273-277.

- Oliveira, J. E. F., Figueredo, R. T. A., Sindeaux-Neto, J. L., Vilhena, M. D. P. S. P., Berrêdo, J. F., Matos, E., Velasco, M. O. S. (2021). Hepatic coccidiosis in *Serrasalmus rhombeus* linnaeus, 1766 from the amazon basin: Morphological and histopathological aspects. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 30(1), 1-8.
- Overstreet, R. M., Hawkins, W. E., Fournie, J. W. (1984). The Coccidian Genus *Calyptospora* n. g. and Family Calyptosporidae n. fam. (Apicomplexa), with Members Infecting Primarily Fishes. *The Journal of Protozoology*, 31(2), 332-339.
- Rambaut, A. (2014). FigTree 1.4. 2 software. Institute of Evolutionary Biology, University Edinburgh.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., Suchard, M. A. (2018) Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901-904.
- Ramos, A. B. M. A., Santos, P. F. S., Hemeterio, L. C. A., Santos, W. J. P., Araújo, R. S., Matos, E. R. (2018). Coccidiose hepática em *Aspistor quadriscutis*, Valenciennes, 1840 (Teleostei: Ariidae) capturados no estuário do nordeste paraense, Amazônia, Brasil. *Archives of Veterinary Science*, 23(3), 63-67.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574.
- Santiago, H., Corrêa, J. L., Tortelly, R., Menezes, R. C., Matos, P., Matos, E. (2012). Morphology and histopathology of *Calyptospora* sp. (Apicomplexa: Calyptosporidae) in speckled peacock bass, *Cichla temensis* Humboldt, 1821 (Perciformes: Cichlidae), from the Marajó-Açu River, Marajó Island, Brazil. *Parasitology Research*, 110(6), 2569-2572.
- Sazima, I., Zamprogno, C. (1985). Use of water hyacinths as shelter, foraging place, and transport by young piranhas, *Serrasalmus spilopleura*. *Environmental Biology of Fishes*, 12(3), 237-240.
- Silva, M. C., São Clemente, S. C., Picanço Júnior, J. A., Silva, M. V. O. (2012). *Calyptospora* sp. in *Brachyplatystoma vaillantii* trapped at the Vigia, State of Pará, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(2), 176-178.
- Silva, A. T., Zina, J., Ferreira, F. C., Gomiero, L. M., Goitein, R. (2015). Caudal fin-nipping by *Serrasalmus maculatus* (Characiformes: Serrasalmidae) in a small water reservoir: Seasonal variation and prey selection. *Zoologia*, 32(6), 457-462.

- Silva, M. F., da Silva, D. T., Giese, E. G., Hamoy, I. G., Matos, E. R. (2018). Morphology and Phylogeny of *Calyptospora paranaidji* n. sp. (Eimeriorina: Calyptosporidae), an Apicomplexan Parasite of the Hepatic Tissue of *Cichla piquiti* Kullander e Ferreira, 2006, From a Reservoir in the Brazilian Amazon Region. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(4), 608-616.
- Silva, M. F., Orlanda, J. F. F., Araújo-Costa, M. J., Hamoy, I., Matos, E. (2020). Hepatic Coccidiosis in *Triportheus angulatus* Spix e Agassiz, 1829 (Characiformes: Triporthidae), a Tropical Fish from the Eastern Brazilian Amazon, with the Description of a New Species of *Calyptospora* (Apicomplexa: Calyptosporidae). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 67(3), 352-358.
- Solangi, M. A., Overstreet, R. M. (1980). Biology and pathogenesis of the coccidium *Eimeria funduli* infecting killifishes. *The Journal of Parasitology*, 66(3), 513-526.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Videira, M., Velasco, M., Tortelly, R., Menezes, R. C., São Clemente, S. C., Matos, E. (2013). An anatomopathological study of Hepatic coccidiosis (*Calyptospora* sp.) in the Acarà-Pixuna, *Aequidens plagiozonatus* Kullander, 1984 from the Brazilian State of Pará. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(1), 91-94.
- Whipps, C. M., Fournie, J. W., Morrison, D. A., Azevedo, C., Matos, E., Thebo, P., Kent, M. L. (2012). Phylogeny of fish-infecting *Calyptospora* species (Apicomplexa: Eimeriorina). *Parasitology Research*, 111(3), 1331-1342.

6. Capítulo II

Descrição taxonômica e filogenética de novas espécies dos gêneros *Henneguya* e *Myxobolus* (Cnidaria: Myxobolidae) parasitando peixes serrasalmídeos provenientes dos três principais rios da Bacia Hidrográfica Tietê-Jacaré, município de Ibitinga, Brasil

Resumo

Estudos de parasitos de peixes têm aumentado gradativamente em diversas regiões do Brasil e do mundo, contribuindo com informações sobre a biodiversidade. Neste contexto, analisamos mixozoários parasitando *Serrasalmus* spp. coletados nos rios Jacaré-Guaçu, Jacaré-Pepira e Tietê, no município de Ibitinga, interior do estado de São Paulo, Brasil. Por meio de dados morfológicos e moleculares com base no gene *ssrDNA* descrevemos quatro novas espécies do gênero *Henneguya* e duas novas espécies de *Myxobolus*. A análise de distância genética das sequências *ssrDNA* de *Henneguya* spp. e *Myxobolus* spp. mostra que *Henneguya* n. sp. 1 e *Henneguya* n. sp. 2 exibem maior similaridade genética com *H. piaractus* e *H. brachypomus*, no qual ambas espécies mostram mais que 10,0% de divergência genética. *Henneguya* n. sp. 3 e *Myxobolus* n. sp. 1 mostra maior similaridade genética com *M. dermatoulcerans* com 4,6% e 10,8% de divergência genética, respectivamente. Portanto, as espécies de mixozoários descritas aqui diferenciam-se das espécies conhecidas de *Henneguya* e *Myxobolus* que parasitam espécies de peixes presentes na América do Sul e em outros continentes pelos aspectos morfológicos e moleculares dos mixoesporos.

Palavras-chave: Água doce, Characiformes, microparasito, Myxosporea, Myxozoa, mixozoários, peixe, São Paulo, *ssrDNA*.

Abstract

Studies of fish parasites have been gradually increasing in several regions of Brazil and the world, contributing with information on biodiversity. In this context, we analyzed myxozoans parasitizing *Serrasalmus* spp. collected from Jacaré-Guaçu, Jacaré-Pepira and Tietê Rivers, in the municipality of Ibitinga, interior of the state of São Paulo, Brazil. Through morphological and molecular data based on the ssrDNA gene we described four new species of the genus *Henneguya* and two new species of *Myxobolus*. Genetic distance analysis of the ssrDNA sequences of *Henneguya* spp. and *Myxobolus* spp. shows that *Henneguya* n. sp. 1 and *Henneguya* n. sp. 2 exhibit higher genetic similarity with *H. piaractus* and *H. brachypomus*, in which both species show more than 10.0% genetic divergence. *Henneguya* n. sp. 3 and *Myxobolus* n. sp. 1 show greater genetic similarity with *M. dermatoulcerans* with 4.6% and 10.8% genetic divergence, respectively. Therefore, the myxozoan species described here differ from the known *Henneguya* and *Myxobolus* species that parasitize fish species present in South America and other continents by the morphological and molecular aspects of the myxospores.

Keywords: Characiformes, fish, freshwater, microparasite, Myxosporidia, Myxozoa, myxozoans, São Paulo, ssrDNA.

1. Introdução

Mixozoários são cnidários endoparasitos com tendência em parasitar anfíbios, répteis, aves, mamíferos terrestres e principalmente peixes dulcícolas e marinhos como hospedeiros vertebrados e intermediários e anelídeos oligoquetas, poliquetas e briozoários, como hospedeiros invertebrados e definitivos (Bartholomew et al., 2008; Chang et al., 2015; Okamura et al., 2015; Székely et al., 2015).

A diversidade desses microparasitos pertencentes a classe Myxozoa Grassé, 1970 vem aumentando gradativamente com mais de 2600 espécies descritas (Okamura et al., 2015; Vidal et al., 2017; Okamura et al., 2018). Espécies pertencentes aos gêneros *Henneguya* Thélohan, 1892 e *Myxobolus* Bütschli, 1882 estão presentes com maior abundância em peixes de água doce, sendo que há aproximadamente 850 espécies de *Myxobolus* e cerca de 200 espécies de *Henneguya* conhecidas (Eiras, 2002; Eiras et al., 2005, 2014, 2021; Eiras e Adriano, 2012).

Tanto peixes selvagens quanto de cultivo podem ser parasitados por alguma espécie de mixozoário (Sindermann, 1987). Algumas espécies desse grupo possuem tendência em causar doenças e mortalidades nos peixes, resultando em grandes perdas econômicas (Kent et al., 2001; Lom e Dyková, 2006; Naldoni et al., 2009; Morsy et al., 2012; Gómez et al., 2014; Okamura et al., 2015).

Espécies do gênero *Serrasalmus* pertencem a família Serrasalmidae e ordem Characiformes e possuem ampla distribuição na América do Sul. Membros deste gênero são conhecidos pelo hábito agressivo de atacar suas presas e possuem alta importância comercial (Lopes et al., 2018).

Não há registro de espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* parasitando *S. maculatus*. Existem apenas três espécies de *Henneguya* e duas espécies de *Myxobolus* descritas parasitando outras espécies do gênero *Serrasalmus*: *H. curvata* Barassa, Adriano, Arana e Cordeiro, 2003 coletada no epitélio interlamelar e lamela branquial de *S. spilopleura* Kner, 1858, *H. pilosa* Azevedo e Matos, 2003 coletada do filamento branquial de *S. altuvei* Ramírez, 1965, *H. striolata* Casal, Matos e Azevedo, 1997 coletada nas brânquias de *S. striolatus* (Steindachner, 1908), *M. serrasalmi* Walliker 1969 parasito de *S. rhombeus* (Linnaeus, 1766) e *M. noguchii* Pinto, 1928 encontrado parasitando *S. spilopleura* (Casal et al., 1997; Azevedo e Matos, 2003; Barassa et al., 2003; Eiras et al., 2005).

Devido a importância comercial das espécies de *Serrasalmus* e nenhum registro de espécies de mixozoários em *S. maculatus*, o objetivo deste estudo foi explorar os microparasitos presentes em *Serrasalmus* spp. coletados nos rios Jacaré-Guaçu, Jacaré-Pepira e Tietê, localizados no município de Ibitinga, interior do estado de São Paulo, Brasil. Seis novas espécies de mixozoários correspondentes aos gêneros *Henneguya* e *Myxobolus* são propostas neste estudo pela combinação das características morfológicas e moleculares. Relações filogenéticas com base no gene da subunidade ribossomal pequena - ssrDNA das espécies de mixozoários dos gêneros *Henneguya* e *Myxobolus* que parasitam peixes também foram inferidas.

2. Material e métodos

2.1. Coleta dos hospedeiros e mixozoários

Vinte e dois espécimes de *S. maculatus* foram coletados no rio Tietê (21°51'02.3"S 48°56'36.9"W) entre junho de 2018 a agosto de 2019, 11 espécimes foram coletados no rio Jacaré-Guaçu (21°50'10.0"S 48°54'53.6"W) entre abril de 2018 a março de 2019, nove espécimes foram coletados no rio Jacaré-Pepira (21°53'30.8"S 48°48'46.0"W) entre julho e setembro de 2018 e um espécime de *Serrasalmus* sp. foi coletado no rio Jacaré-Pepira. Os espécimes de peixes foram coletados nos rios Tietê, Jacaré-Guaçu e Jacaré-Pepira, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. Os peixes foram submetidos à narcose que foi induzida utilizando Eugenol (óleo de cravo) e sacrificados através do método físico de secção medular com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, nº 1109 da Universidade Estadual Paulista/UNESP. Após, os peixes foram transportados ao Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres - LAPAS e necropsiados.

Os órgãos dos espécimes de peixes foram separados e analisados sob estereomicroscópio para verificar a presença de plasmódios. Os plasmódios desenvolvidos no estômago, brânquias, rim e coração foram removidos, rompidos entre lâmina e lamínula e analisados sob microscópio de luz. Mixoesporos maduros pertencentes às espécies dos gêneros *Henneguya* e *Myxobolus* foram identificados.

2.2. Análise morfológica

Mixoesporos das espécies de mixozoários aqui descritas foram analisados morfológicamente e morfometricamente utilizando microscópio com contraste de interferência diferencial (DIC) (Leica DMLB 5000, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) acoplado ao software LAS V3.8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) com amplificação de 1000 ×. As dimensões dos mixoesporos foram obtidas conforme proposto por Lom e Arthur (1989) em micrômetros (µm) e estão expressadas por média ± desvio padrão e o intervalo dos valores mínimo e máximo estão entre parênteses. A porcentagem de prevalências das espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* parasitando o hospedeiro *S. maculatus* foram obtidas seguindo Bush et al. (1997).

2.3. Análise molecular e filogenética

Plasmódios com mixoesporos foram armazenados em etanol 100% (Merck®). A extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) foi realizada usando o kit Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) conforme o protocolo do fabricante. O DNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) a 360 nm. O ssrDNA foi amplificado usando os primers específicos para mixozoários e eucarióticos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Primers forward e reverse usados para amplificação de ssrDNA das novas espécies de *Henneguya* e *Myxobolus*. Combinação de primers: ERIB 1 - ACT1r, Myxgen4F - ERIB10 e MX3, MB5 - MX3, MC5 - MB3, MyxospecF - MyxospecR.

Primer	Sequência 5' - 3'	Referências
ERIB1	ACCTGGTTGATCCTGCCAG	Barta et al. (1997)
Myxgen4F	GTGCCTTGAATAAATCAGAG	Kent et al. (2000)
MB5	GGTGATGATTAACAGGAGCGGT	Molnár et al. (2002)
MC5	CCTGAGAAACGGCTACCACATCCA	Molnár et al. (2002)
MyxospecF	TTCTGCCCTATCAACTWGTTG	Fiala (2006)
ACT1r	AATTCACCTCTCGCTGCCA	Hallett e Diamant (2001)
ERIB10	CTTCCGCAGGTTACCTAGG	Barta et al. (1997)
MX3	CCAGGACATCTTAGGGCATCACAGA	Andree et al. (1999)
MB3	CCAACCGCTCCTGTTAATCATC	Molnár et al. (2002)
MyxospecR	GGTTTCNCDGRGGGMCCAAC	Fiala (2006)

As reações em cadeia de polimerase (PCR) consistiram em: 25 µl de 2X PCR Taq MasterMix, 3 µl de extração de DNA, 1 µl de primer forward, 1 µl de primer reverse e 20 µl de água nuclease-Free para completar o volume total de 50 µl. As PCR foram realizadas no termociclador (Mastercycler® nexus) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de 94°C por 40 s, anelamento a 55°C por 40 s, extensão a 72°C por 1 min e 30s e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos das PCR geradas foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corados com UniSafe Dye 0,03% (v/v) e visualizadas sob luz ultravioleta (UV).

Os produtos das PCR foram purificados usando o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen Inc., California, EUA) e foram sequenciados com os mesmos pares de primers usados nas PCR. O sequenciamento foi realizado com o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems™ Inc., California, EUA) usando analisador de DNA automático por eletroforese capilar no equipamento ABI3730xl (Applied Biosystems™ Inc., California, EUA). As reações de precipitações por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio foram realizadas de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante.

As sequências parciais obtidas foram editadas usando o software Geneious 7.1.3 (Kearse et al., 2012) e as sequências consensos geradas do gene *ssrDNA* foram submetidas ao “Basic Local Alignment Search Tool” (BLASTn) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) para verificar a similaridade genética das novas espécies com outras espécies de mixozoários disponíveis no GenBank.

As sequências parciais do *ssrDNA* das novas espécies foram alinhadas com 62 sequências *ssrDNA* referentes às espécies de mixozoários parasitos de peixes correspondentes aos gêneros *Heneguya* e *Myxobolus* mais próximos (com >80% de similaridade) para cada uma das novas espécies com base na busca BLASTn usando o algoritmo MUSCLE acoplado ao software Geneious 7.1.3 com configuração padrão. *Ceratomyxa amazonensis* Mathews, Naldoni, Maia e Adriano, 2016 (KX236169) foi usada como outgroup. O melhor modelo de evolução (GTR + G + I) foi selecionado usando jModelTest2 on XSEDE (Darriba et al., 2012) conforme o critério de informação Akaike (AIC).

As análises filogenéticas foram realizadas usando os métodos de maximum likelihood (ML) e inferência Bayesiana (IB). A análise por ML foi realizada no software RAxML-HPC v.8 on XSEDE 8.2.12 (Stamatakis, 2014) com topologia avaliada por bootstrap com 1000 replicações. A análise por IB foi realizada usando o software

MrBayes on XSEDE 3.2.7a (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) com probabilidade posterior estimada por 10 milhões de gerações com duas corridas paralelas de quatro cadeias simultâneas usando o algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC). O burn-in foi de 10%. As análises feitas pelo jModelTest2, RAxML e MrBayes foram geradas pelo servidor CIPRES (Miller et al., 2010). As árvores filogenéticas geradas foram visualizadas no FigTree 1.4.4 (Rambaut, 2014) e editadas no Adobe Illustrator 24.0.

A análise de distância genética foi realizada utilizando o software Geneious 7.1.3 para determinar a similaridade genética e diferenças de nucleotídeos das espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* que parasitam espécies de peixes da ordem Characiformes da América do Sul. Esta comparação genética foi realizada com as espécies que possuem maior similaridade morfométrica em relação as espécies descritas aqui e também com as espécies que estão relacionadas filogeneticamente com as novas espécies de mixozoários.

3. Resultados

Na **Tabela 2** estão as informações individuais dos espécimes de peixes analisados e parasitados de acordo com o rio de coleta.

Tabela 2. Quantidade de espécimes de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 e *Serrasalmus* sp. analisados e parasitados correspondente aos rios Jacaré-Guaçu, Jacaré-Pepira e Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil e as respectivas espécies de parasitos e órgãos parasitados.

Espécies hospedeiras	Quantidade de peixes analisados	Quantidade de peixes parasitados (porcentagem)	Parasitos	Localidades geográficas	Órgãos infectados
<i>Serrasalmus maculatus</i>	22	2 (9,1%)	<i>Henneguya</i> n. sp. 1	Rio Tietê	Estômago
		4 (18,2%)	<i>Henneguya</i> n. sp. 2		Brânquias
		1 (11,1%)	<i>Henneguya</i> n. sp. 3		Lamela branquial
<i>Serrasalmus maculatus</i>	9	3 (33,3%)	<i>Myxobolus</i> n. sp. 1	Rio Jacaré-Pepira	Rim e coração
		1 (11,1%)	<i>Myxobolus</i> n. sp. 2		Rim
<i>Serrasalmus</i> sp.	1	1	<i>Henneguya</i> n. sp. 4	Rio Jacaré-Pepira	Lamelas branquiais
<i>Serrasalmus maculatus</i>	11	1 (9,1%)	<i>Henneguya</i> n. sp. 1	Rio Jacaré-Guaçu	Estômago

O conjunto de análises morfológicas e moleculares do gene *ssrDNA* possibilitou a identificação das novas espécies de parasitos correspondentes aos gêneros *Henneguya* e *Myxobolus*. Infecções por *Henneguya* n. sp. 3 na lamela branquial e *Myxobolus* n. sp. 1 no coração foram simultâneas no mesmo espécime hospedeiro. *Myxobolus* n. sp. 1 e *Myxobolus* n. sp. 2 foram coletados dentro do mesmo plasmódio.

3.1. Resumo taxonômico

Filo Cnidaria Verrill, 1865

Subfilo Endocnidozoa Schuchert, 1996

Classe Myxozoa Grassé, 1970

Subclasse Myxosporea Bütschli, 1881

Ordem Bivalvulida Shulman, 1959

Família Myxobolidae Thélohan, 1892

Gênero *Henneguya* Thélohan, 1892

Espécie *Henneguya* n. sp. 1 (**Figura 1 A-C**).

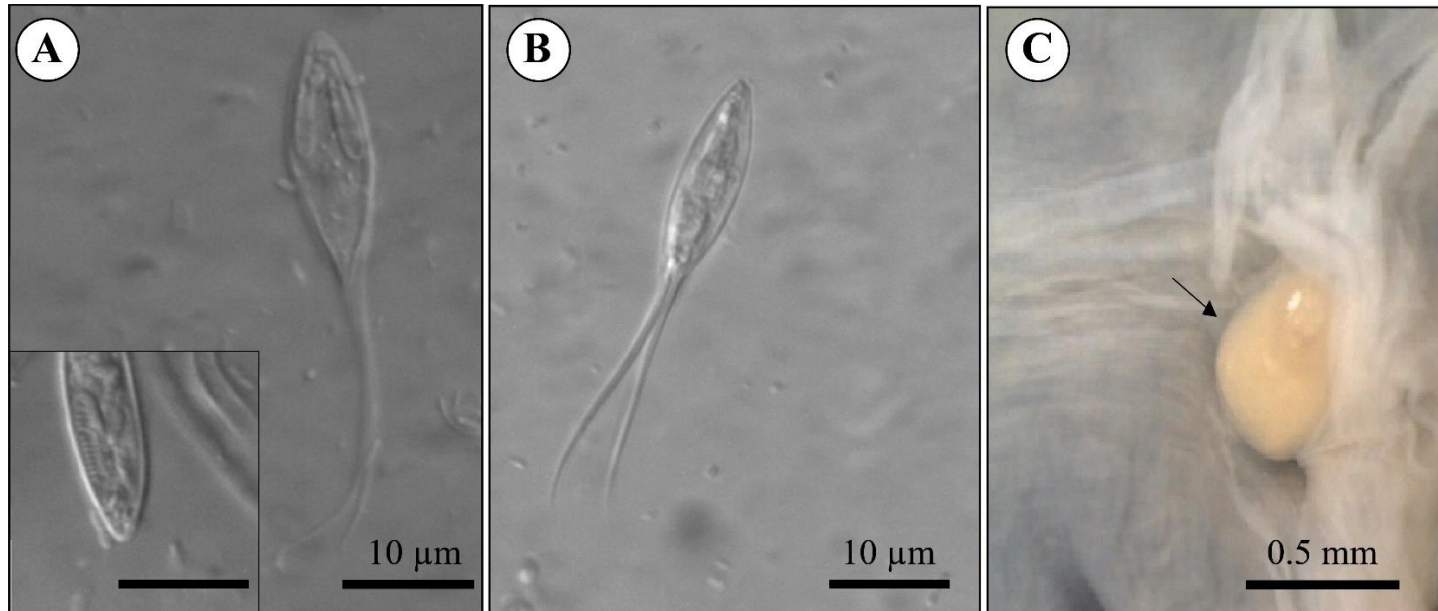


Figura 1. Fotomicrografia dos mixoesporos maduros e plasmódio de *Henneguya* n. sp. 1 parasitando o estômago de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 coletado no rio Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A-B.** Vista frontal e lateral, respectivamente dos mixoesporos de *Henneguya* n. sp. 1. Destaque: túbulo polar com 10-12 voltas. Barra de escala: 10 µm. **C.** Plasmódio (seta) contendo mixoesporos de *Henneguya* n. sp. 1 localizado no estômago de *S. maculatus*.

Hospedeiro-tipo: *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 (Characiformes: Serrasalminidae).

Localidade-tipo: rio Tietê (21°51'02.3"S 48°56'36.9"W), município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil.

Outra localidade: rio Jacaré-Guaçu (21°50'10.0"S 48°54'53.6"W), município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil.

Prevalência: 2 de 22 (9,1%) peixes analisados coletados no rio Tietê e 1 de 11 (9,1%) peixes analisados coletados no rio Jacaré-Guaçu estavam parasitados.

Abundância: em média dois plasmódios por hospedeiro parasitado.

Órgão infectado: estômago.

Descrição: plasmódios amarelados coletados do estômago mediram ~0,4 mm. Mixoesporos maduros (n= 30) com forma elipsoidal em vista frontal têm 38,5±2,4 (33,1-42,4) µm de comprimento total, 16,9±0,8 (15,0-18,5) µm de comprimento do corpo, 6,0±0,5 (4,9-7,3) µm de largura do corpo e 22,1±2,3 (17,2-26,2) µm de comprimento dos apêndices caudais. Mixoesporos em vista lateral apresentam 5,3±0,4 (4,6-5,7) µm de espessura. As cápsulas polares são cônicas com tamanho igual e ocupam até a metade do corpo dos mixoesporos, medindo 7,3±0,6 (6,2-8,7) µm de comprimento e 1,5±0,2 (1,2-1,9) µm de largura. O túbulo polar enrolado constitui-se de 10-12 voltas.

3.2. Resumo taxonômico

Filo Cnidaria Verrill, 1865

Subfilo Endocnidozoa Schuchert, 1996

Classe Myxozoa Grassé, 1970

Subclasse Myxosporea Bütschli, 1881

Ordem Bivalvulida Shulman, 1959

Família Myxobolidae Thélohan, 1892

Gênero *Henneguya* Thélohan, 1892

Espécie *Henneguya* n. sp. 2 (**Figura 2 A-B**).

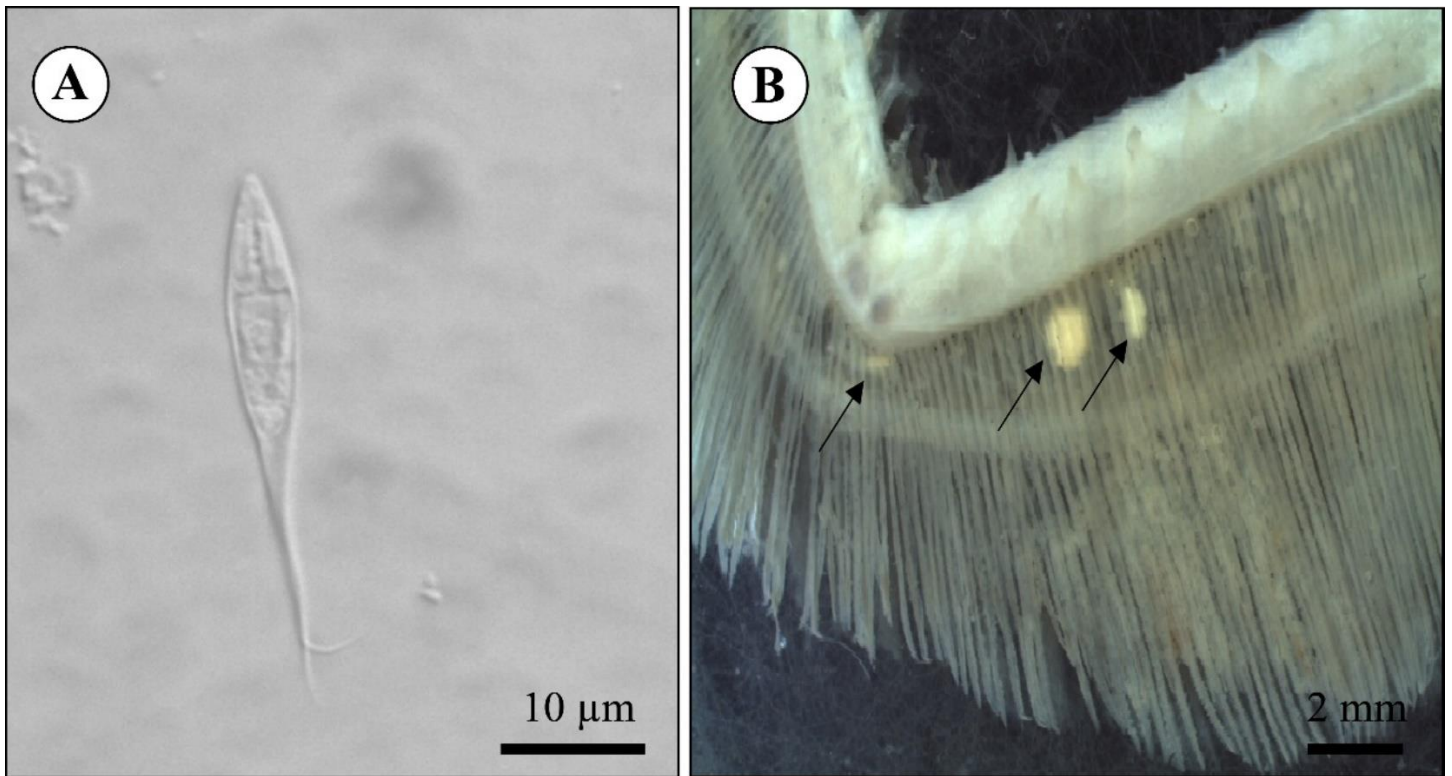


Figura 2. Fotomicrografia do mixoesporo maduro e plasmódios de *Henneguya* n. sp. 2 parasitando as brânquias de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 coletado do rio Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Vista frontal do mixoesporo de *Henneguya* n. sp. 2. **B.** Plasmódios (setas) contendo mixoesporos de *Henneguya* n. sp. 2 localizados nas lamelas branquiais de *S. maculatus*.

Hospedeiro-tipo: *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 (Characiformes: Serrasalminidae).

Localidade-tipo: rio Tietê (21°51'02.3"S 48°56'36.9"W), município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil.

Prevalência: 4 de 22 (18,2%) peixes analisados estavam parasitados.

Abundância: em média cinco plasmódios por hospedeiro parasitado.

Órgão infectado: arco branquial e lamela branquial.

Descrição: plasmódios amarelados alongados e arredondados foram encontrados no arco branquial e lamelas branquiais medindo ~1 mm. Mixoesporos maduros (n= 34) são fusiformes na extremidade anterior medindo $36,3 \pm 2,0$ (32,4-40,5) μm de comprimento total, $17,2 \pm 0,7$ (16,1-19,4) μm de comprimento do corpo, $4,6 \pm 0,3$ (4,1-5,3) μm de largura do corpo e $19,2 \pm 2,3$ (14,1-24,8) μm de comprimento dos apêndices caudais. As cápsulas polares ocupam menos que a metade do corpo dos mixoesporos, têm

formato cônico e tamanho igual medindo $6,5\pm 0,4$ ($5,3-7,1$) μm de comprimento e $1,5\pm 0,2$ ($1,1-1,9$) μm de largura. O número de voltas do túbulo polar enrolado é de 5-6.

3.3. Resumo taxonômico

Filo Cnidaria Verrill, 1865

Subfilo Endocnidozoa Schuchert, 1996

Classe Myxozoa Grassé, 1970

Subclasse Myxosporea Bütschli, 1881

Ordem Bivalvulida Shulman, 1959

Família Myxobolidae Thélohan, 1892

Gênero *Henneguya* Thélohan, 1892

Espécie *Henneguya* n. sp. 3 (**Figura 3 A-B**).

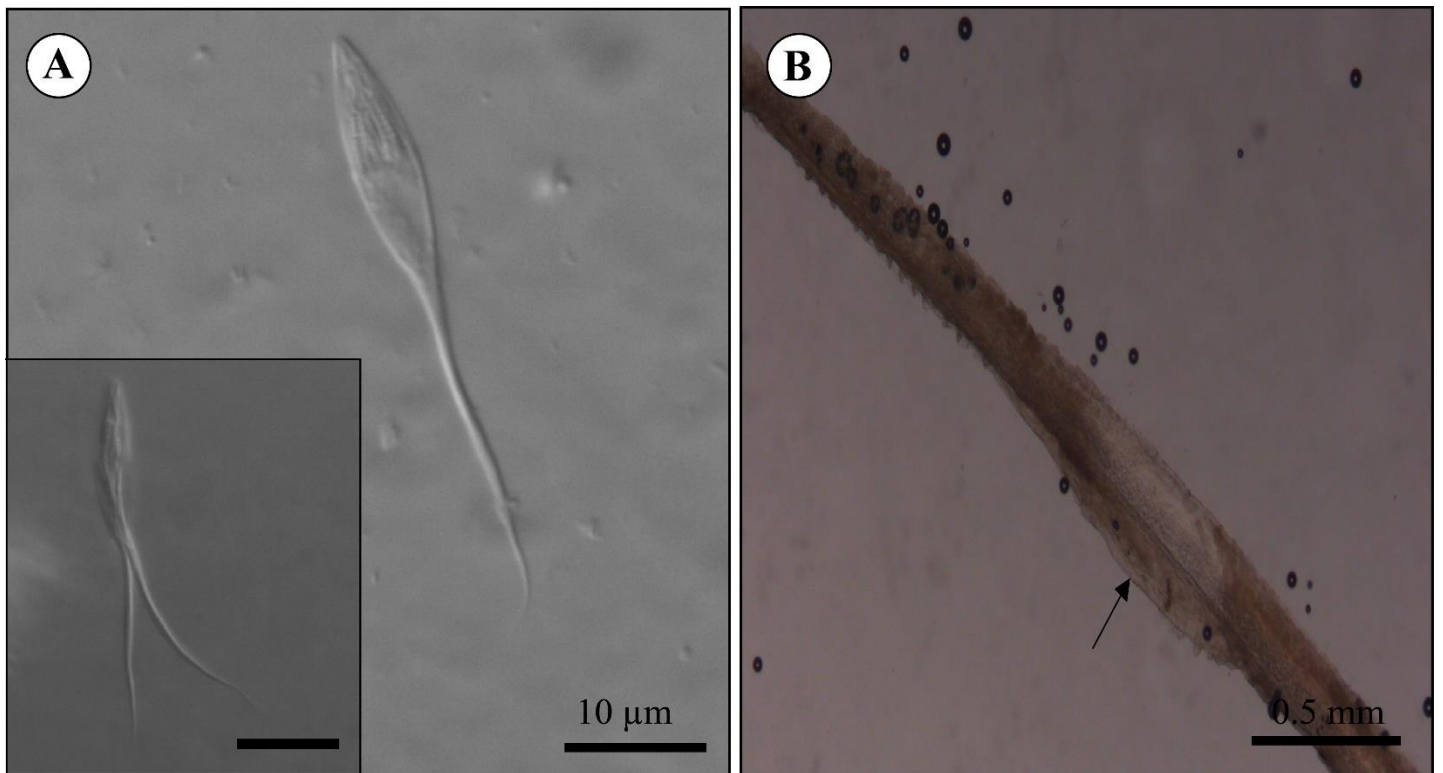


Figura 3. Fotomicrografia dos mixoesporos maduros e plasmódio de *Henneguya* n. sp. 3. parasitando as brânquias de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 coletado no rio Jacaré-Pepira, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Vista frontal do mixoesporo de *Henneguya* n. sp. 3. Destaque: mixoesporo em vista lateral. Barra de escala: 10 μm . **B.** Plasmódio contendo *Henneguya* n. sp. 3 (seta) na lamela branquial de *S. maculatus*.

Hospedeiro-tipo: *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 (Characiformes: Serrasalminidae).

Localidade-tipo: rio Jacaré-Pepira (21°53'30.8"S 48°48'46.0"W), município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil.

Prevalência: 1 de 9 (11,1%) peixes analisados estava parasitado.

Abundância: dois plasmódios.

Órgão infectado: lamela branquial.

Descrição: plasmódios arredondados foram encontrados nas lamelas branquiais, medindo ~0,2 mm. Mixoesporos maduros (n= 32) são fusiformes na extremidade anterior medindo 39,1±2,3 (34,9-44,4) µm de comprimento total, 16,7±1,0 (14,9-19,8) µm de comprimento do corpo, 4,4±0,3 (4,0-5,0) µm de largura do corpo e 23,1±1,6 (20,1-27,4) µm de comprimento dos apêndices caudais. As cápsulas polares ocupam menos que a metade dos mixoesporos, têm formato cônico e tamanho igual medindo 7,2±0,5 (6,4-8,8) µm de comprimento e 1,4±0,2 (1,1-1,9) µm de largura. O túbulo polar constitui-se de 9-11 voltas.

3.4. Resumo taxonômico

Filo Cnidaria Verrill, 1865

Subfilo Endocnidozoa Schuchert, 1996

Classe Myxozoa Grassé, 1970

Subclasse Myxosporea Bütschli, 1881

Ordem Bivalvulida Shulman, 1959

Família Myxobolidae Thélohan, 1892

Gênero *Henneguya* Thélohan, 1892

Espécie *Henneguya* n. sp. 4 (**Figura 4**).



Figura 4. Vista frontal do mixoesporo de *Henneguya* n. sp. 4 coletado das lamelas branquiais de *Serrasalmus* sp. proveniente do rio Jacaré-Pepira, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. Destaque: mixoesporo com única cápsula polar. Barra de escala: 5 μ m.

Hospedeiro-tipo: *Serrasalmus* sp. (Characiformes: Serrasalminidae).

Localidade-tipo: rio Jacaré-Pepira (21°53'30.8"S 48°48'46.0"W), município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil.

Prevalência: 1 peixe analisado estava parasitado.

Abundância: um plasmódio.

Órgão infectado: lamela branquial.

Descrição: mixoesporos maduros (n=58) têm forma elipsoidal a fusiforme medindo $32,5 \pm 1,6$ (28,5-36,2) μ m de comprimento total, $15,5 \pm 0,7$ (13,2-16,9) μ m de comprimento do corpo, $5,2 \pm 0,3$ (4,5-6,5) μ m de largura do corpo e $17,1 \pm 1,4$ (13,6-20,4) μ m de comprimento dos apêndices caudais. As cápsulas polares têm tamanho desigual, formato fusiforme e ocupam menos que a metade do corpo dos mixoesporos. Alguns mixoesporos têm a presença de apenas uma cápsula polar, mas com a mesma

morfometria. As cápsulas polares maiores apresentam $6,3\pm 0,5$ (5,1-7,5) μm de comprimento e $1,6\pm 0,2$ (1,1-1,9) μm de largura, enquanto que as cápsulas polares menores têm $5,6\pm 0,5$ (4,4-6,7) μm de comprimento e $1,5\pm 0,2$ (1,1-1,8) μm de largura. O túbulo polar contem de 4-5 voltas.

3.5. Resumo taxonômico

Filo Cnidaria Verrill, 1865

Subfilo Endocnidozoa Schuchert, 1996

Classe Myxozoa Grassé, 1970

Subclasse Myxosporea Bütschli, 1881

Ordem Bivalvulida Shulman, 1959

Família Myxobolidae Thélohan, 1892

Gênero *Myxobolus* Bütschli, 1882

Espécie *Myxobolus* n. sp. 1 (**Figuras 5A-B, 6**)

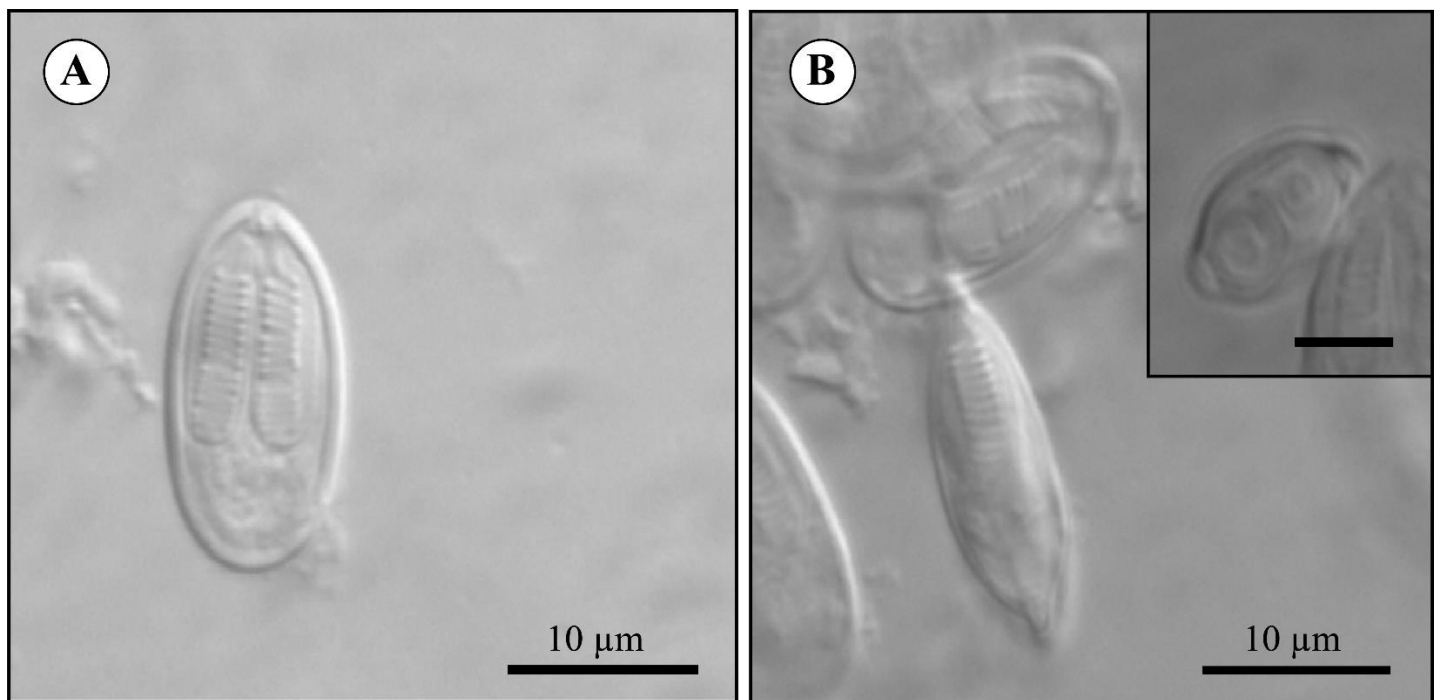


Figura 5. Fotomicrografia dos mixoesporos maduros de *Myxobolus* n. sp. 1 encontrado parasitando o rim de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 coletado no rio Jacaré-Pepira, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A-B.** Vista frontal e lateral, respectivamente dos mixoesporos de *Myxobolus* n. sp. 1. Destaque: mixoesporo em vista apical. Barra de escala: 5 μm .

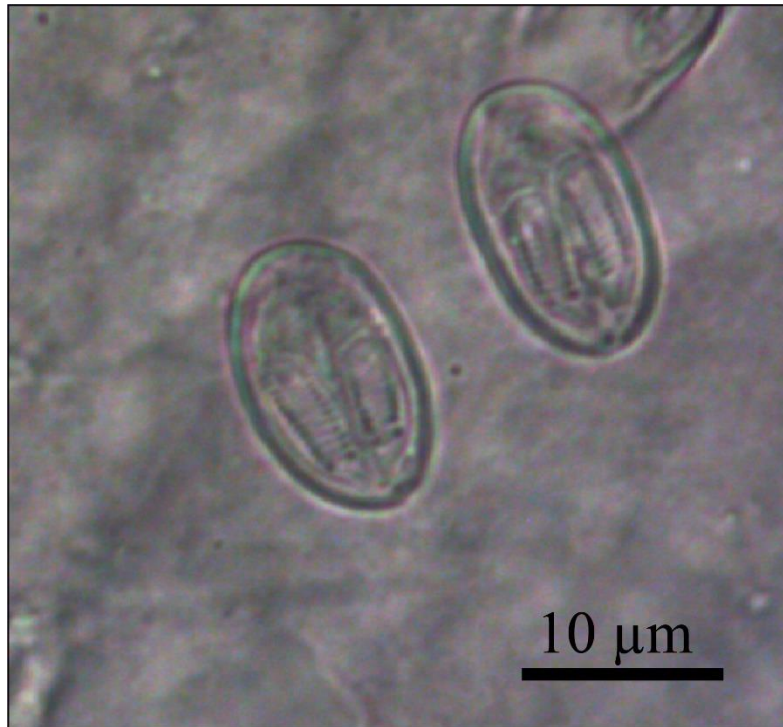


Figura 6. Fotomicrografia dos mixoesporos maduros de *Myxobolus* n. sp. 1 encontrado parasitando o coração de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 coletado no rio Jacaré-Pepira, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil.

Hospedeiro-tipo: *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 (Characiformes: Serrasalminidae).

Localidade-tipo: rio Jacaré-Pepira (21°53'30.8"S 48°48'46.0"W), município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil.

Prevalência: 3 de 9 (33,3%) peixes analisados estavam parasitados.

Abundância: em média três plasmódios coletado do rim e um plasmódio coletado do coração.

Local de infecção: rim e coração.

Descrição: plasmódios arredondados e transparentes foram coletados do rim e coração. Mixoesporos de *Myxobolus* n. sp. 1 coletados do rim e coração têm a mesma morfometria. Mixoesporos maduros (n= 85) são elipsoidais, medindo $15,3 \pm 0,7$ (14,2-16,9) μm de comprimento, $10,2 \pm 0,5$ (8,7-11,1) μm de largura. As cápsulas polares são alongadas, com tamanho igual e ocupam mais da metade do corpo dos mixoesporos, medindo $7,5 \pm 0,6$ (6,3-9,7) μm de comprimento e $3,2 \pm 0,3$ (2,1-4,0) μm de largura. Cada cápsula polar tem túbulo polar com 13-14 voltas.

3.6. Resumo taxonômico

Filo Cnidaria Verrill, 1865

Subfilo Endocnidozoa Schuchert, 1996

Classe Myxozoa Grassé, 1970

Subclasse Myxosporea Bütschli, 1881

Ordem Bivalvulida Shulman, 1959

Família Myxobolidae Thélohan, 1892

Gênero *Myxobolus* Bütschli, 1882

Espécie *Myxobolus* n. sp. 2 (**Figura 7**)

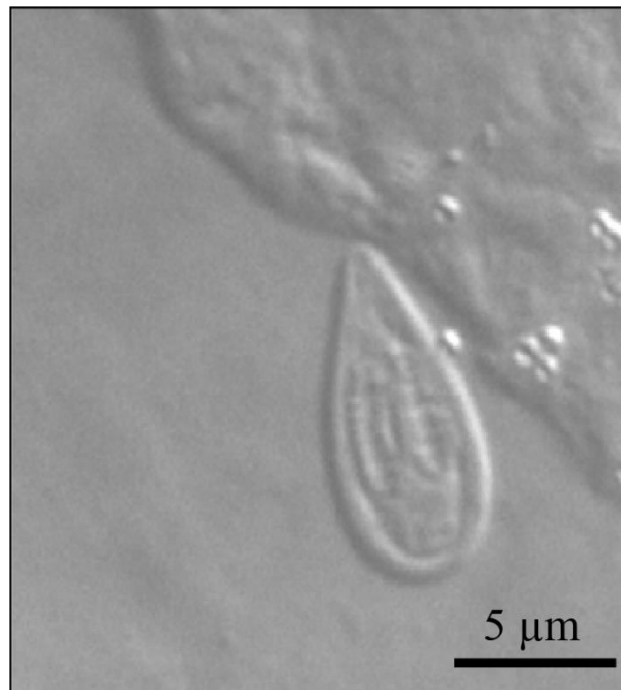


Figura 7. Vista frontal do mixoespore de *Myxobolus* n. sp. 2 que estava parasitando o rim de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 coletado no rio Jacaré-Pepira, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil.

Hospedeiro-tipo: *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 (Characiformes: Serrasalmidae).

Localidade-tipo: rio Jacaré-Pepira (21°53'30.8"S 48°48'46.0"W), município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil.

Prevalência: 1 de 9 (11,1%) peixes analisados estava parasitado.

Abundância: um plasmódio.

Local de infecção: rim.

Descrição: mixoesporos maduros (n=46) com forma cônica têm $10,1\pm 0,9$ (8,6-14,9) μm de comprimento, $5,7\pm 0,6$ (4,6-7,7) μm de largura. As cápsulas polares alongadas e do mesmo tamanho ocupam a metade do corpo do mixoesporos e medem $4,7\pm 1,0$ (3,5-7,4) μm de comprimento e $1,2\pm 0,2$ (0,8-1,7) μm de largura. Túbulo polar constitui-se com 7-8 voltas.

3.7. Análise molecular e filogenética

Sequências parciais do gene *ssrDNA* de *Henneguya* n. sp. 1 (1891 pb), *Henneguya* n. sp. 2 (1627 pb), *Henneguya* n. sp. 3 (1584 pb) e *Myxobolus* n. sp. 1 (1580 pb) foram obtidas e comparadas geneticamente. A análise de distância genética (**Tabela 3**) com as novas espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* que parasitam peixes serrasalmídeos mostra que *Henneguya* n. sp. 1 exibe 83,7%, 71,2% e 71,5% de similaridade genética e diferença de 269, 480 e 472 nucleotídeos com as espécies *Henneguya* n. sp. 2, *Henneguya* n. sp. 3 e *Myxobolus* n. sp. 1, respectivamente. *Henneguya* n. sp. 2 mostra 67,9% e 68,6% de similaridade genética e diferença de 543 e 513 nucleotídeos com as espécies *Henneguya* n. sp. 3 e *Myxobolus* n. sp. 1, respectivamente. *Henneguya* n. sp. 3 apresenta 89,3% de similaridade genética e 167 nucleotídeos distintos com *Myxobolus* n. sp. 1.

Foi realizada também análise de distância genética com as espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* que parasitam espécies de peixes da ordem Characiformes, no qual mostra que *H. piaractus* Martins e Souza, 1997 e *H. brachypomus* Capodifoglio, Adriano, Naldoni, Meira, Silva e Maia, 2020 são as espécies geneticamente mais semelhantes a *Henneguya* n. sp. 1 e *Henneguya* n. sp. 2 com 87,3% e 84,8% de similaridade genética e com 249 e 248 nucleotídeos diferentes, respectivamente. A espécie *M. dermatoulcerans* Stilwell, Stilwell, Camus, Ware, Rosser e Griffin, 2020 mostra maior proximidade genética com as espécies *Henneguya* n. sp. 3 e *Myxobolus* n. sp. 1 com 95,4% e 89,2% de similaridade e 76 e 171 nucleotídeos diferentes, respectivamente.

Portanto, com as informações genéticas aqui relatadas pode-se verificar que as novas espécies de mixozoários não têm correspondência com nenhuma sequência *ssrDNA* de espécies de mixozoários disponíveis no GenBank.

Tabela 3. Matriz de distância genética das sequências ssrDNA de *Henneguya* n. sp. 1, *Henneguya* n. sp. 2, *Henneguya* n. sp. 3 e *Myxobolus* n. sp. 1 com algumas espécies de mixozoários que parasitam espécies de peixes da ordem Characiformes da América do Sul. Valores no canto superior direito representam a porcentagem de similaridade de nucleotídeos e valores direcionados ao canto inferior esquerdo indicam o número de nucleotídeos diferentes. Os códigos após o nome das espécies correspondem ao acesso no GenBank.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>Henneguya</i> n. sp. 1		83.7	71.2	71.5	87.2	87.4	79.2	70.4	72.3	79.0
2 <i>Henneguya</i> n. sp. 2	269		67.9	68.6	84.8	84.7	78.2	67.8	67.7	79.0
3 <i>Henneguya</i> n. sp. 3	480	543		89.3	69.2	69.2	69.4	83.3	95.4	69.8
4 <i>Myxobolus</i> n. sp. 1	472	513	167		69.0	69.5	68.7	82.5	89.2	69.3
5 <i>Henneguya piaractus</i> KF597016	248	251	521	521		93.9	78.5	68.8	70.5	78.8
6 <i>Henneguya brachypomus</i> MK491272	245	251	522	514	118		78.7	68.6	69.4	78.2
7 <i>Henneguya pellucida</i> KF296352	332	349	499	493	346	342		68.5	69.3	84.8
8 <i>Myxobolus longus</i> MW038820	581	538	271	282	618	627	510		83.1	67.1
9 <i>Myxobolus dermatoulcerans</i> MT912631	539	543	76	171	580	621	498	328		68.5
10 <i>Myxobolus tambaquiensis</i> MW038821	408	347	509	509	415	430	242	650	625	

A topologia da árvore filogenética obtida da análise por IB mostra claramente distinção das espécies descritas aqui com outras espécies dos gêneros *Henneguya* e *Myxobolus* a partir das sequências ssrDNA disponíveis no GenBank. A análise filogenética revela dois clados principais: clado A e B (**Figura 8**). O clado A está composto por espécies de *Henneguya* e *Myxobolus*. *Henneguya* n. sp. 1 e *Henneguya* n. sp. 2 aparecem no subclado A1 exibindo afinidade genética e são taxas irmãs das espécies *H. piaractus* e *H. brachypomus*, parasitos também de peixes serrasalmídeos.

O clado B está composto exclusivamente por espécies de *Myxobolus* que parasitam espécies de peixes da ordem Characiformes, exceto pela nova espécie de *Henneguya* n. sp. 3. *Henneguya* n. sp. 3 e *Myxobolus* n. sp. 1 estão relacionadas filogeneticamente com *M. dermatoulcerans* e agrupadas no subclado B2. *M. dermatoulcerans* pertence também à peixe serrasalmídeo, compondo a linhagem de *Myxobolus* spp. parasitos de espécies de peixes da ordem Characiformes. Pode-se observar a mesma topologia filogenética na análise por ML.

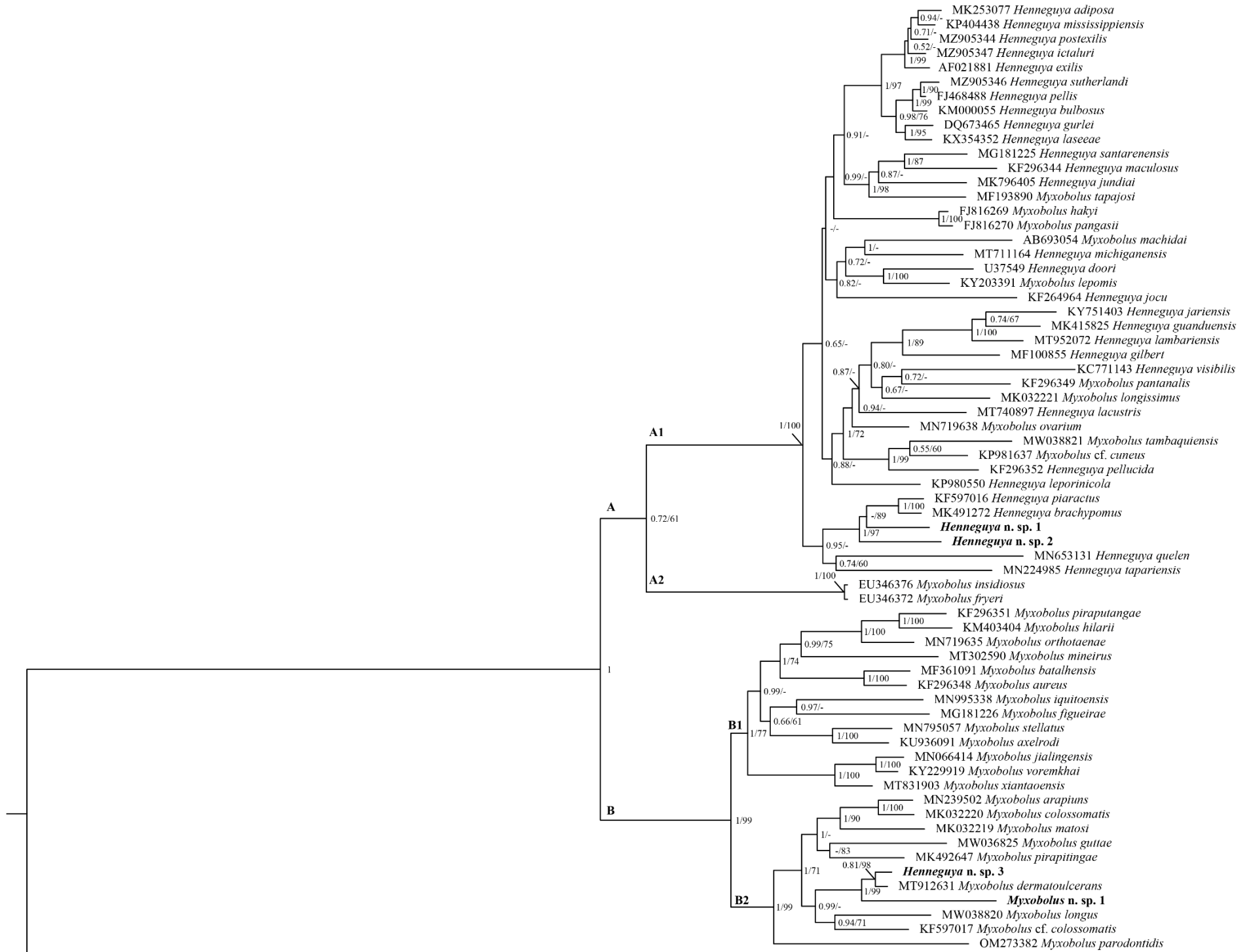


Figura 8. Árvore filogenética gerada pela análise de inferência Bayesiana baseada nas sequências parciais de ssrDNA de espécies de mixozoários dos gêneros *Henneguya* e *Myxobolus* com *Henneguya* n. sp. 1, *Henneguya* n. sp. 2, *Henneguya* n. sp. 3 e *Myxobolus* n. sp. 1. Os números dos nós representam os valores de suporte e estão indicados por probabilidade posterior (BI)/bootstrap (ML). Valores menores que 0.60/60 estão representados por traços (-).

3.8. Comentários

Henneguya n. sp. 1 e *Henneguya* n. sp. 2 têm a morfometria semelhante, porém *Henneguya* n. sp. 2 apresenta dimensões dos mixoesporos menores e o túbulo polar com menos número de voltas (5-6 voltas vs 10-12 voltas) quando comparados aos mixoesporos de *Henneguya* n. sp. 1. Além do mais, as espécies diferenciam-se em relação aos órgãos parasitados (brânquias vs estômago) e têm diferença no formato dos mixoesporos (fusiforme vs elipsoidal).

Henneguya n. sp. 3 tem a morfometria do corpo do mixoesporo semelhante aos mixoesporos de *Henneguya* n. sp. 1, porém as espécies diferenciam-se principalmente pela largura dos mixoesporos (4,4 µm vs 6,0 µm), formato dos mixoesporos (fusiforme vs elipsoidal) e órgão infectado (brânquias vs estômago). Assim como, *Henneguya* n. sp. 3 mostra morfometria semelhante à algumas características de *Henneguya* n. sp. 2, como o mesmo formato fusiforme dos mixoesporos e o mesmo órgão infectado, embora exibe diferença no comprimento dos apêndices caudais (23,1 µm vs 19,2 µm) e no número de voltas do túbulo polar (9-11 voltas vs 5-6 voltas). Mixoesporos de *Henneguya* n. sp. 4 apresenta comprimento total, largura do corpo e comprimento dos apêndices caudais menores em relação às demais espécies de *Henneguya* aqui descritas.

Não há registro de outras espécies de *Henneguya* parasitando *S. maculatus*, mas as quatro novas espécies de *Henneguya* deste estudo foram comparadas com *Henneguya* spp. que parasitam espécies de peixes pertencentes ao gênero *Serrasalmus*. *Henneguya* n. sp. 1 apresenta maior semelhança morfométrica com *H. curvata* parasito de *S. spilopleura*, mas mostra diferenças no comprimento total do corpo dos mixoesporos (38,5 µm vs 41,7 µm), na largura do corpo dos mixoesporos (6,0 µm vs 4,7 µm), no órgão infectado (estômago vs brânquias) e no formato dos mixoesporos (elipsoidal vs fusiforme). Da mesma forma, *Henneguya* n. sp. 3 tem maior similaridade com *H. curvata*,

porém os mixoesporos da presente espécie têm os apêndices caudais menores quando comparados aos mixoesporos de *H. curvata*.

Henneguya n. sp. 2 tem maior similaridade com *H. striolata*, embora esta última tem o comprimento total dos mixoesporos maiores (36,3 µm vs 42,2 µm). *Henneguya* n. sp. 4 também tem maior similaridade com *H. striolata*, mas diferenciam-se por algumas dimensões serem distintas, tais como, comprimento total dos mixoesporos (32,5 µm vs 42,2 µm), comprimento dos apêndices caudais (17,1 µm vs 25,9 µm) e pelo número de voltas do túbulo polar (4-5 voltas vs 13-14 voltas). Não foi possível comparar a similaridade genética de *Henneguya* n. sp. 1, *Henneguya* n. sp. 2 e *Henneguya* n. sp. 3 com as espécies *H. curvata* e *H. striolata*, pois não há sequências de ssrDNA disponíveis para essas espécies no GenBank.

Henneguya n. sp. 1 e *Henneguya* n. sp. 2 também exibem maior semelhança morfométrica com *H. pellucida* Adriano, Arana e Cordeiro, 2005 parasito de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). A principal diferença entre as espécies é que *H. pellucida* tem o comprimento das cápsulas polares menores (7,3 µm vs 6,5 µm vs 4,0 µm). Além disso, *H. pellucida* forma o plasmódio na cavidade visceral e bexiga natatória, enquanto que *Henneguya* n. sp. 1 forma plasmódio no estômago e *Henneguya* n. sp. 2 forma os plasmódios nas brânquias. Existe uma sequência parcial do gene ssrDNA para *H. pellucida* disponível no GenBank, no entanto, quando comparada com as sequências parciais de *Henneguya* n. sp. 1 e *Henneguya* n. sp. 2 apresenta cerca de 20% de diferença genética, como também, na análise filogenética *H. pellucida* fica em linhagem separada das duas novas espécies.

As sequências ssrDNA de *Henneguya* n. sp. 1 e *Henneguya* n. sp. 2 têm maior afinidade genética com as espécies *H. piaractus* e *H. brachypomus* exibindo mais que 10% diferença genética. Devido a isso, realizamos as análises morfométricas entre essas espécies e notamos que as espécies se diferenciam especialmente pelo comprimento dos mixoesporos e dos apêndices caudais e pelos hospedeiros (*S. maculatus* vs *P. mesopotamicus* e *P. brachypomus*).

Henneguya n. sp. 3 foi comparada com outras espécies de *Henneguya* que parasitam espécies de peixes serrasalmídeos, mas em pelo menos em uma característica morfológica as espécies são diferentes. A sequência ssrDNA de *Henneguya* n. sp. 3 exibe maior similaridade genética com *M. dermatoulcerans* parasito de *Pygocentrus nattereri* (Kner 1858) com 4,6% de diferença genética, mas não mostram similaridade morfológica e morfométrica, pois *Henneguya* n. sp. 3 tem presença dos apêndices caudais e os

mioxesporos da presente espécie têm a largura do corpo e as cápsulas polares menores quando comparado com os mioxesporos de *M. dermatoulcerans*, além disso, o órgão infectado (brânquias vs pele), o tipo de hospedeiro (*S. maculatus* vs *P. nattereri*) e a localidade geográfica (Brasil vs Peru) são diferentes.

Henneguya n. sp. 4 mostra maior similaridade com *H. pilosa* Azevedo e Matos 2003, mas diferenciam-se principalmente pelo comprimento do corpo dos mioxesporos (15,5 µm vs 11,4 µm), comprimento dos apêndices caudais (17,1 µm vs 24,1 µm), número de volta do túbulo polar (4-5 voltas vs 6-7 voltas) e órgão infectado (brânquias vs órgãos internos). Infelizmente não foi possível a amplificação do gene *ssrDNA* da espécie *Henneguya* n. sp. 4, sendo assim, as comparações entre as espécies são apenas com base nas características morfológicas.

Myxobolus n. sp. 1 foi comparado morfológicamente e morfometricamente com *Myxobolus* n. sp. 2, mas todas as dimensões dos mioxesporos são maiores em relação a esta última espécie, além da diferença no formato dos mioxesporos (elipsoidal vs cônico). Quando *Myxobolus* n. sp. 1 foi comparado com outras espécies conhecidas de *Myxobolus* que parasitam espécies de peixes do gênero *Serrasalmus*, *Myxobolus* n. sp. 1 tem maior similaridade com *M. serrasalmi*, mas este último tem o comprimento e largura dos mioxesporos menores e infelizmente não tem a sequência *ssrDNA* para esta espécie.

Myxobolus n. sp. 1 foi comparado com *Myxobolus* spp. que parasitam espécies de peixes da família Serrasalmidae. *Myxobolus* n. sp. 1 tem maior similaridade com *M. longus* Silva, Adriano, Vieira, Naldoni e Santos 2021 parasito de *Colossoma macropomum* (Cuvier 1816), mas diferenciam-se pela largura dos mioxesporos (10,1 µm vs 7,1 µm), comprimento das cápsulas polares (7,5 µm vs 9,2 µm), formato dos mioxesporos (elipsoidal vs cônico) e órgãos infectados (rim, coração vs brânquias). Além das diferenças morfométricas, as duas espécies têm divergência genética de 17,5%. *Myxobolus* n. sp. 1 também foi comparado com *Myxobolus* spp. que parasitam espécies de peixes da ordem Characiformes e a nova espécie exibe maior semelhança com os mioxesporos de *M. associatus* Nemeček, 1926 em relação a todas as dimensões, porém diferenciam-se pela espécie hospedeira parasitada (*S. maculatus* vs *Leporinus mormyrops* Steindachner, 1875), mas para esta espécie também não há sequência *ssrDNA* disponível no GenBank.

A espécie mais próxima geneticamente de *Myxobolus* n. sp. 1 também é *M. dermatoulcerans* com 10,7% de diferença genética, mas na análise morfométrica as duas espécies diferenciam-se, pois *M. dermatoulcerans* tem o comprimento dos mioxesporos

(16,1 μm vs 15,3 μm) e comprimento das cápsulas polares (9,2 μm vs 7,5 μm) maiores em relação aos mixoesporos de *Myxobolus* n. sp. 1. Além do mais, as duas espécies diferenciam-se pelo hospedeiro (*P. nattereri* vs *S. maculatus*), pelos órgãos infectados (superfície vs rim, coração) e pela localidade geográfica (Peru vs Brasil).

Myxobolus n. sp. 2 não apresenta nenhuma similaridade morfométrica com as espécies de *Myxobolus* descritas em espécies de peixes do gênero *Serrasalmus*. Portanto, quando *Myxobolus* n. sp. 2 é comparado com outros *Myxobolus* spp. que parasitam espécies de peixes da família Serrasalminidae mostra maior similaridade com *M. tambaquiensis* Silva, Adriano, Vieira, Naldoni e Santos 2021, porém diferenciam-se pela largura dos mixoesporos (5,7 μm vs 6,5 μm), formato dos mixoesporos (cônico vs elipsoidal) e órgãos parasitados (rim vs opérculo). *Myxobolus* n. sp. 2 também tem maior similaridade com *M. pirapitingae* Capodifoglio, Adriano, Naldoni, Meira, Silva e Maia 2020, mas distinguem-se pela largura dos mixoesporos (5,7 μm vs 7,0 μm), pela largura das cápsulas polares (1,2 μm vs 2,0 μm), formato dos mixoesporos (cônico vs elipsoidal) e pelos órgãos infectados (rim vs ceco pilórico). Infelizmente para *Myxobolus* n. sp. 2 também não alcançamos a amplificação do gene *ssrDNA*, portanto não foi possível as comparações moleculares e filogenéticas com outras espécies de mixozoários.

As espécies de mixozoários foram comparadas com outras espécies pertencentes aos gêneros *Henneguya* e *Myxobolus* descritas em espécies de peixes coletadas no Brasil e em outros países, mas apresentam diferença em pelo menos uma característica dos mixoesporos (Eiras, 2002; Eiras et al., 2005, 2014, 2015; Eiras e Adriano, 2012). As novas espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* também foram comparadas com outras espécies *Henneguya* (**Tabela 4**) e *Myxobolus* (**Tabela 5**) que parasitam espécies de peixes serrasalmídeos com base nas dimensões dos mixoesporos, hospedeiro e órgão infectado.

Tabela 4. Comparação das características morfométricas dos mixoesporos, hospedeiros e órgãos infectados de *Henneguya* n. sp. 1, *Henneguya* n. sp. 2, *Henneguya* n. sp. 3 e *Henneguya* n. sp. 4 com algumas espécies de *Henneguya* pertencentes a espécies de peixes da ordem Characiformes presentes na América do Sul. Comprimento total do mixoesporo (CTM), comprimento do corpo do mixoesporo (CM), largura do corpo do mixoesporo (LM), espessura do corpo do mixoesporo (EM), comprimento dos apêndices caudais (CAC), comprimento das cápsulas polares (CCP), largura das cápsulas polares (LCP), ^a=cápsulas polares maiores, ^b=cápsulas polares menores, número de voltas do túbulo polar (TP), órgãos infectados (OI), informação ausente (-). As medidas estão representadas em micrometro (µm) e estão expressadas por média ± desvio padrão. O intervalo dos valores mínimo e máximo estão entre parênteses.

Espécies	CTM	CM	LM	EM	CAC	CCP	LCP	TP	Hospedeiros	OI	Referências	
<i>Henneguya</i> n. sp. 1	38,5±2,4	16,9±0,8	6,0±0,5	5,3±0,4	22,1±2,3	7,3±0,6	1,5±0,2	10-12	<i>Serrasalmus maculatus</i>	Kner,	Estômago	Presente estudo
	(33,1-42,4)	(15,0-18,5)	(4,9-7,3)	(4,6-5,7)	(17,2-26,2)	(6,2-8,7)	(1,2-1,9)					
<i>Henneguya</i> n. sp. 2	36,3±2,0	17,2±0,7	4,6±0,3	-	19,2±2,3	6,5±0,4	1,5±0,2	5-6	<i>S. maculatus</i>		Brânquias	Presente estudo
	(32,4-40,5)	(16,1-19,4)	(4,1-5,3)		(14,1-24,8)	(5,3-7,1)	(1,1-1,9)					
<i>Henneguya</i> n. sp. 3	39,1±2,3	16,7±1,0	4,4±0,3	-	23,1±1,6	7,2±0,5	1,4±0,2	9-11	<i>S. maculatus</i>		Brânquias	Presente estudo
	(34,9-44,4)	(14,9-19,8)	(4,0-5,0)		(20,1-27,4)	(6,4-8,8)	(1,1-1,9)					
<i>Henneguya</i> n. sp. 4	32,5±1,6	15,5±0,7	5,2±0,3	-	17,1±1,4	6,3±0,5	1,6±0,2	4-5	<i>Serrasalmus</i> sp.		Brânquias	Presente estudo
	(28,5-36,2)	(13,2-16,9)	(4,5-6,5)		(13,6-20,4)	(5,1-7,5) ^a	(1,1-1,9) ^a					

<i>H. curvata</i> Barassa, Adriano, Arana e Cordeiro, 2003	41,7±2,7	16,4±0,8	4,7±0,2	-	25,3±2,3	7,8±0,3	1,4±0,2	10-11	<i>S. spilopleura</i> Kner, 1858	Brânquias	Barassa et al. (2003)
<i>H. striolata</i> Casal, Matos e Azevedo, 1997	42,2 (39,3- 45,6)	15,8 (14,4- 17,0)	5,3 (4,9-5,9)	-	25,9 (23,6- 29,8)	6,8 (5,1-7,0)	1,2 (1,1-1,3)	13-14	<i>S. striolatus</i> (Steindachner, 1908)	Brânquias	Casal et al. (1997)
<i>H. pellucida</i> Adriano, Arana e Cordeiro, 2005	33,3±1,5	11,4±0,3	4,1±0,4	-	24,1±1,5	4,0±0,4	1,6±0,2	6-7	<i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887)	Cavidade visceral e bexiga natatória	Adriano et al. (2005a)
<i>H. garavelli</i> Martins e Onaka, 2006	46,6±2,4 (41,2- 51,5)	13,6±1,0 (12,0- 14,4)	4,0±0,1 (3,9-4,1)	3,2±0,5 (2,4-4,0)	33,0±2,6 (29,2- 37,5)	5,4±0,4 (4,8-6,0)	1,2±0,1 (1,0-1,5)	-	<i>Cyphocarax nagelli</i> (Steindachner, 1881)	Brânquias	Martins e Onaka (2006)
<i>H. brachypomus</i> Capodifoglio, Adriano, Naldoni, Meira, da Silva e Maia, 2020	57,5±3,5 (52,4- 61,6)	13,0±0,5 (11,7- 13,8)	4,3±0,2 (4,0-4,6)	3,8±0,2 (3,5-4,3)	44,7±3,0 (40,5- 48,1)	6,3±0,5 (5,6-7,3)	1,6±0,2 (1,3-2,0)	8-9	<i>P. brachypomus</i> (Cuvier, 1818)	Brânquias	Capodifoglio et al. (2020a)
<i>H. piaractus</i> Martins e Souza (1997)	52,5	12,7	3,6		41,2	6,7	1,2	8-9	<i>P. mesopotamicus</i>	Brânquias	Martins e Souza (1997)

<i>H. tapariensis</i>												
Capodifoglio, Meira, da Silva, Corrêa, Adriano e Maia, 2020	53,4±2,8 (47,4-59,0)	13,5±0,4 (12,5-14,4)	3,6±0,2 (3,1-3,9)	2,5±0,4 (1,9-3,2)	40,3±2,7 (35,0-44,8)	5,0±0,4 (4,1-5,9)	1,3±0,1 (1,0-1,7)	4-5	<i>P. brachypomus</i>	Brânquias	Capodifoglio et al. (2020b)	
<i>H. pilosa</i> Azevedo e Matos, 2003	54,2 (52,3-56,0)	21,1 (20,0-23,1)	5,9 (5,5-6,3)	2,2 (1,9-2,6)	31,1 (30,5-34,9)	7,4 (7,1-7,6)	1,2 (1,0-1,3)	11-12	<i>S. altuvei</i> Ramírez, 1965	Brânquias	Azevedo e Matos (2003)	
<i>H. caudalongula</i>												
Adriano, Arana e Cordeiro, 2005	71,0±1,4	16,6±0,5	4,6±0,2	-	52,6±1,5	6,1±0,2	1,6±0,2	10-11	<i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1837)	Brânquias	Adriano et al. (2005b)	

Tabela 5. Comparação das características morfológicas dos mixoesporos, hospedeiros e órgãos infectados de *Myxobolus* n. sp. 1 e *Myxobolus* n. sp. 2 com algumas espécies de *Myxobolus* pertencentes a espécies de peixes da ordem Characiformes da América do Sul. Comprimento do corpo do mixoesporo (CM), largura do corpo do mixoesporo (LM), espessura do corpo do mixoesporo (EM), comprimento das cápsulas polares (CCP), largura das cápsulas polares (LCP), número de voltas do túbulo polar (TP), órgãos infectados (OI), informação ausente (-). As medidas estão representadas em micrometro (μm) e estão expressadas por média \pm desvio padrão. O intervalo dos valores mínimo e máximo estão entre parênteses.

Espécies	CM	LM	EM	CCP	LCP	TP	Hospedeiro	OI	Referências
<i>Myxobolus</i> n. sp. 1	15,3 \pm 0,7 (14,2-16,9)	10,2 \pm 0,5 (8,7-11,1)	-	7,5 \pm 0,6 (6,3-9,7)	3,2 \pm 0,3 (2,1-4,0)	13-14	<i>Serrasalmus maculatus</i> Kner, 1858	Rim	Presente estudo
<i>Myxobolus</i> n. sp. 1	15,7	10,2	-	7,9	3,0	-	<i>S. maculatus</i>	Coração	Presente estudo
<i>Myxobolus</i> n. sp. 2	10,1 \pm 0,9 (8,6-14,9)	5,7 \pm 0,6 (4,6-7,7)	-	4,7 \pm 1,0 (3,5-7,4)	1,2 \pm 0,2 (0,8-1,7)	7-8	<i>S. maculatus</i>	Rim	Presente estudo
<i>M. associatus</i> Nemeczek, 1926	15,0	10,0	-	7,0	-	-	<i>Leporinus mormyrops</i> Steindachner, 1875	Rim	Nemeczek (1926)
<i>M. serrasalmi</i> Walliker, 1969	14,8 (12,5-18,0)	8,6 (7,0-10,0)	-	7,7 (6,0-9,0)	3,1 (2,5-4,0)	-	<i>Serrasalmus rhombeus</i> (Linnaeus, 1766)	Baço, rim e fígado	Walliker (1969)
<i>M. longus</i> Silva, Adriano, Vieira, Naldoni e Santos, 2021	16,4 \pm 0,6 (14,7-17,3)	7,1 \pm 0,2 (6,8-7,7)	5,5 \pm 0,6 (4,4-6,6)	9,2 \pm 0,5 (7,3-10,1)	2,5 \pm 0,3 (2,0-3,1)	10-12	<i>Colossoma macropomum</i> (Cuvier 1816)	Brânquias	Silva et al. (2021)

<i>M. dermatoulcerans</i>										
Stilwell, Stilwell, Camus, Ware, Rosser e Griffin, 2020	16,1 (14,3-17,8)	8,9 (7,6-10,3)	6,4 (6,0-6,9)	9,2 (7,4-10,2)	3,0 (2,1-3,7)	11-13	<i>Pygocentrus nattereri</i> (Kner 1858)	Pele	Stilwell et al. (2020)	
<i>M. noguchii</i> Pinto, 1928	13,6	8,5	-	6,8	2,2	-	<i>Serrasalmus spilopleura</i> Kner, 1858	Brânquia	Pinto (1928)	
<i>M. hilarii</i>										
Capodifoglio, Adriano, Milanin, Silva e Maia, 2016	11,5±0,8 (9,8-13,4)	11,0±0,7 (9,7-12,4)	7,6±1,0 (6,7-9,0)	6,5±0,4 (6,0-7,2)	4,0±0,2 (3,6-5,3)	5-7	<i>Brycon hilarii</i> (Valenciennes, 1850)	Rim	Capodifoglio et al. (2016)	
<i>M. tambaquiensis</i>										
Silva, Adriano, Vieira, Naldoni e Santos, 2021	10,0±0,4 (9,5-11,3)	6,5±0,2 (6,1-7,1)	4,6±0,4 (3,9-5,6)	4,9±0,2 (4,4-5,3)	1,9±0,2 (1,5-2,2)	8-9	<i>C. macropomum</i>	Opérculo	Silva et al. (2021)	
<i>M. guttae</i> Silva, Adriano, Vieira, Naldoni e Santos, 2021										
Adriano, Vieira, Naldoni e Santos, 2021	12,3±0,6 (10,3-13,5)	8,1±0,3 (7,1-8,6)	5,1±0,6 (4,5-6,5)	6,8±0,5 (5,8-7,6)	2,5±0,3 (1,8-3,1)	9-10	<i>C. macropomum</i>	Nadadeira	Silva et al. (2021)	

<i>M. arapiuns</i> Capodifoglio, Meira, da Silva, Corrêa, Adriano e Maia, 2020	12,9±0,5	7,5±0,3	5,4±0,2	5,4±0,2	2,2±0,1	4-5	<i>P. brachypomus</i>	Ceco pilórico	Capodifoglio et al. (2020b)
<i>M. pirapitingae</i> Capodifoglio, Adriano, Naldoni, Meira, da Silva e Maia, 2020	10,4±0,3 (10,0-11,1)	7,2±0,1 (7,0-7,6)	5,8±0,2 (5,4-6,3)	3,8±0,1 (3,5-4,0)	2,3±0,1 (2,0-2,6)	6-7	<i>P. brachypomus</i>	Ceco pilórico	Capodifoglio et al. (2020a)
<i>Myxobolus</i> sp.	12,5	7,3		6,2	2,8	8-10	<i>Metynniss hypsauchen</i> (Müller e Troschel, 1844)	Rim	Oliveira et al. (2020)
<i>M. longissimus</i> Capodifoglio, Adriano, Silva e Maia, 2019	19,1±0,4 (18,0-20,0)	9,4±0,3 (8,6-10,4)	8,3±0,4 (7,6-8,9)	10,5±0,2 (9,7-11,1)	2,5±0,1 (2,1-2,8)	9-10	<i>C. macropomum</i>	Estômago, intestino e arco branquial	Capodifoglio et al. (2019)

<i>M. matosi</i>										
Capodifoglio, Adriano, Silva e Maia, 2019	9,6±0,4 (9,1-10,8)	7,0±0,3 (6,5-7,6)	5,0±0,3 (4,6-5,5)	4,3±0,4 (3,3-5,0)	1,9±0,1 (1,6-2,2)	-	<i>C. macropomum</i>	Opérculo	Capodifoglio et al. (2019)	
<i>M. piraputangae</i>										
Carriero, Adriano, Silva, Ceccarelli e Maia, 2013	10,1±0,5	8,7±0,5	6,7±0,3	5,2±0,4	3,0±0,3	4-5	<i>B. hilarii</i>	Rim	Carriero et al. (2013)	
<i>M. myleus</i> Azevedo, Clemente, Casal, Matos, Alves, Al-Quraishy e Matos, 2012	19,3±0,5 (19,0-20,0)	8,3±0,5 (7,9-9,0)	4,0±0,3 (3,5-4,5)	13,2±0,4 (12,5-13,5)	3,0±0,3 (2,5-3,5)	19-21	<i>Myleus rubripinnis</i> (Müller e Troschel, 1844)	Vesícula biliar	Azevedo et al. (2012)	
<i>M. cuneus</i> Adriano, Arana e Cordeiro, 2006	10,0±0,6	5,1±0,3	-	5,7±0,3	1,7±0,2	8-9	<i>P. mesopotamicus</i>	Brânquia, barbatanas, superfície e órgãos internos	Adriano et al. (2006)	
<i>M. cf. cuneus</i>	10,5±0,3 (9,9-11,2)	5,4±0,3 (4,9-6,0)	4,3±0,3 (4,0-4,9)	6,0±0,4 (5,2-6,8)	2,0±0,3 (1,3-2,5)	9-10	Patinga	Pele	Milanin et al. (2015)	

<i>M. metynnis</i> Casal, Matos e Azevedo, 2006	13,1 (12,9-13,5)	7,8 (7,5-8,3)	3,9 (3,4-4,5)	5,2 (5,0-5,5)	3,2 (3,0-3,6)	8-9	<i>Metynnis</i> Ahl, 1923	<i>argenteus</i>	Região orbicular	Casal et al. (2006)
<i>M. maculatus</i> Casal, Matos e Azevedo, 2002	21,0 (19,7-23,0)	8,9 (7,9-9,5)	7,5 (7,2-7,9)	12,7 (11,8-13,8)	3,2 (3,0-3,6)	14-15	<i>Metynnis</i> (Kner, 1858)	<i>maculatus</i>	Rim	Casal et al. (2002)
<i>M. colossomatis</i> Molnár e Békési, 1993	11,8 (11,4-12,2)	6,9 (6,6-7,2)	3,7 (3,5-4,0)	6,0 (5,8-6,6)	2,1 (1,8-2,5)	7-8	<i>C. macropomum</i>		Brânquia, fígado e músculo	Molnár e Békési (1993)

4. Discussão

Os dados filogenéticos gerados mostram que os mixosporídeos estão agrupados conforme a ordem ou família do hospedeiro, como observados em outros estudos (Kent et al., 2001; Fiala, 2006; Ferguson et al., 2008; Carriero et al., 2013; Negrelli et al., 2019; Vieira et al. 2021, Vieira et al., 2022a). Além disso, é possível observar que as espécies de mixozoários que parasitam espécies de peixes da família Serrasalmidae não são monofiléticos, pois as linhagens das espécies são distintas na árvore filogenética gerada, corroborando com outros estudos (Capodifoglio et al., 2019, 2020a,b; Silva et al., 2021).

A classificação taxonômica dos mixozoários consiste principalmente pela morfologia dos mixoesporos, sendo assim, Lom e Dyková (1992) inferiram que a presença de apêndices caudais nos mixoesporos é uma característica que contribui para a separação das espécies dos gêneros *Henneguya* e *Myxobolus*. Porém, a análise filogenética deste estudo contribui com estudos filogenéticos anteriores no qual membros da família Myxobolidae não suportam a separação entre espécies de *Henneguya* e espécies de *Myxobolus* (Kent et al., 2001; Fiala, 2006; Liu et al., 2010). Devido a isso, são necessários os estudos complementares, tais como as análises moleculares e filogenéticas para classificação das espécies de mixozoários (Bartošová et al., 2011).

Constantemente novas espécies de mixozoários estão sendo descritas em espécie de peixes dulcícolas e marinhos da América do Sul, assim como, são comuns os estudos de mixozoários parasitos em espécies de peixes pertencentes a ordem Characiformes na América do Sul (Eiras, 2002; Eiras et al., 2005, 2014, 2021; Eiras e Adriano, 2012), mas ainda assim, muitos hospedeiros podem ter novas espécies, a fim de ampliar o estudo de mixozoários.

No Brasil há cerca de 40 espécies de *Henneguya* que parasitam as brânquias de peixes e em relação à essas espécies conhecidas, cerca de 25 espécies foram descritas parasitando espécies de peixes da ordem Characiformes (Kent et al., 2001; Úngari et al., 2021). *Henneguya* n. sp. 1 foi coletada parasitando o estômago de *S. maculatus*, mas esse tipo de infecção não foi registrado anteriormente em espécies de peixes serrasalmídeos coletados na América do Sul. *Henneguya* n. sp. 2 e *Henneguya* n. sp. 3 foram coletadas das brânquias de *S. maculatus* e quanto a esse tipo de infecção é a mais comum, pois de nove espécies de *Henneguya* conhecidas que parasitam espécies de peixes serrasalmídeos, apenas uma espécie (*H. pellucida*) não foi coletada das brânquias de seu hospedeiro. Sendo assim, *Henneguya* n. sp. 2 e *Henneguya* n. sp. 3 foram comparadas

morfometricamente com essas espécies que parasitam as brânquias, mas diferenciam-se em pelo menos alguma dimensão dos mixoesporos (Eiras 2002; Eiras e Adriano, 2012).

Alguns mixoesporos de *Henneguya* n. sp. 4 têm apenas uma cápsula polar, característica incomum e não registrada anteriormente em espécies pertencentes a esse gênero. Embora, características incomuns das cápsulas polares são também observadas nos mixoesporos de *M. cataractae* Vieira, Narciso e Silva 2022, assim como nos mixoesporos de outras espécies do gênero *Myxobolus*, no qual contêm três cápsulas polares (Mathews et al., 2016; Vieira et al., 2022b). As cápsulas polares têm a função de ancorar o túbulo polar no hospedeiro alvo e iniciar a infecção, sendo assim, como já relatado por Vieira et al. (2022b) quando há menor número de cápsulas polares nos mixoesporos, estes podem ter dificuldade no momento de fixação no hospedeiro e consequentemente reduzir a transmissão parasitária (Fiala et al., 2015; Okamura et al., 2015).

Há em torno de 168 espécies de *Myxobolus* descritas parasitando o rim de peixes de todos os continentes. Destas, apenas cinco espécies (*M. hilarii* Capodifoglio, Adriano, Milanin, Silva e Maia 2016, *M. associatus* Nemeček, 1926, *M. maculatus* Casal, Matos, e Azevedo 2002, *M. serrasalmi* e *M. piraputangae* Carriero, Adriano, Silva, Ceccarelli e Maia 2013) foram encontradas parasitando o rim de peixes coletados na América do Sul, no qual estes cinco registros foram feitos exclusivamente no Brasil. Assim como, cerca de 18 espécies de *Myxobolus* foram relatadas parasitando o coração de peixes, com apenas uma espécie (*M. cuneus*) descrita no Brasil. Porém, a análise morfométrica mostra que os mixoesporos de *Myxobolus* n. sp. 1 são diferentes em pelo menos uma das características em relação aos mixoesporos das espécies de *Myxobolus* que parasitam o rim e coração dos peixes (Eiras et al., 2005; Eiras et al., 2014, 2021).

O presente estudo expande conhecimentos sobre a biodiversidade microparasitária que ainda é escassa no interior do estado de São Paulo e contribui com informações sobre a relação filogenética dos mixozoários, descrevendo seis novas espécies sob aspectos taxonômicos e filogenéticos. Além do mais, este é o primeiro registro de espécies dos gêneros *Henneguya* e *Myxobolus* parasitando a espécie *S. maculatus*.

5. Referência

- Adriano, E. A., Arana, S., Cordeiro, N. S. (2005a). An ultrastructural and histopathological study of *Henneguya pellucida* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. *Parasite*, 12(3), 221-227.
- Adriano, E. A., Arana, S., Cordeiro, N. S. (2005b). Histopathology and ultrastructure of *Henneguya caudalongula* sp. n. infecting *Prochilodus lineatus* (Pisces: Prochilodontidae) cultivated in the state of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(2), 177-181.
- Adriano, E. A., Arana, S., Cordeiro, N. S. (2006). *Myxobolus cuneus* n. sp. (Myxosporea) infecting the connective tissue of *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) in Brazil: histopathology and ultrastructure. *Parasite*, 13(2), 137-142.
- Andree, K. B., Székely, C., Molnár, K., Gresoviac, S. J., Hedrick, R. P. (1999). Relationships among Members of the Genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bilvalvidae) Based on Small Subunit Ribosomal DNA Sequences. *The Journal of Parasitology*, 85(1), 68.
- Azevedo, C., Matos, E. (2003). Fine structure of *Henneguya pilosa* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea), parasite of *Serrasalmus altuvei* (Characidae), in Brazil. *Folia Parasitologica*, 50(1), 37-42.
- Azevedo, C., São Clemente, S. C., Casal, G., Matos, P., Alves, Â., Al-Quraishy, S., Matos, E. (2012). *Myxobolus myleus* n. sp. infecting the bile of the Amazonian freshwater fish *Myleus rubripinnis* (Teleostei: Serrasalminidae): morphology and pathology. *Systematic Parasitology*, 82(3), 241-247.
- Barassa, B., Adriano, E., Arana, S., Cordeiro, N. S. (2003). *Henneguya curvata* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae) parasitizing the gills of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae: Serrasaminae), a South American freshwater fish. *Folia Parasitologica*. 50. 151-153.
- Barta, J. R., Martin, D. S., Liberator, P. A., Dashkevicz, M., Anderson, J. W., Feighner, S. D., Elbrecht, A., Perkins-Barrow, A., Jenkins, M. C., Danforth, H. D. (1997). Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *The Journal of Parasitology*, 83, 262-271.

- Bartholomew, J. L., Atkinson, S. D., Hallett, S. L., Lowenstine, L. J., Garner, M. M., Gardiner, C. H., Rideout, B. A., Keel, M. K., Brown, J. D. (2008). Myxozoan parasitism in waterfowl. *The International Journal for Parasitology*, 38(10), 1199-1207.
- Bartošová, P., Fiala, I. (2011). Molecular evidence for the existence of cryptic species assemblages of several myxosporeans (Myxozoa). *Parasitology Research*, 108, 573-583,
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., Shostak, A. W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology*, 83(4), 575-583.
- Capodifoglio, K. R., Adriano, E. A., Milanin, T., Silva, M. R., Maia, A. A. (2016). Morphological, ultrastructural and phylogenetic analyses of *Myxobolus hilarii* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), a renal parasite of farmed *Brycon hilarii* in Brazil. *Parasitology International*, 65(3), 184-190.
- Capodifoglio, K., Adriano, E. A., Silva, M., Maia, A. (2019). The resolution of the taxonomic dilemma of *Myxobolus colossomatis* and description of two novel myxosporeans species of *Colossoma macropomum* from Amazon basin. *Acta Tropica*, 191, 17-23.
- Capodifoglio, K., Adriano, E. A., Naldoni, J., Meira, C. M., da Silva, M., Maia, A. (2020a). Novel myxosporean species parasitizing an economically important fish from the Amazon basin. *Parasitology Research*, 119(4), 1209-1220.
- Capodifoglio, K., Meira, C. M., Silva, M., Corrêa, L. L., Adriano, E. A., Maia, A. (2020b). Morphology and molecular data of two novel cnidarian myxosporean (Myxobolidae) infecting *Piaractus brachipomus* from the Amazon basin. *Acta Tropica*, 209, 105533.
- Carriero, M. M., Adriano, E. A., Silva, M. R., Ceccarelli, P. S., Maia, A. A. (2013). Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. *PloS One*, 8(9), e73713.
- Casal, G., Matos, E., Azevedo, C. (1997). Some ultrastructural aspects of *Henneguya striolata* sp. nov. (Myxozoa, Myxosporea), a parasite of the Amazonian fish *Serrasalmus striolatus*. *Parasitology Research*, 83(1), 93-95.
- Casal, G., Matos, E., Azevedo, C. (2002). Ultrastructural data on the spore of *Myxobolus maculatus* n. sp. (phylum Myxozoa), parasite from the Amazonian fish *Metynnias maculatus* (Teleostei). *Diseases of Aquatic Organisms*, 51(2), 107-112.

- Casal, G., Matos, E., Azevedo, C. (2006). A new myxozoan parasite from the Amazonian fish *Metynniss argenteus* (Teleostei, Characidae): light and electron microscope observations. *The Journal of Parasitology*, 92(4), 817–821.
- Chang, E. S., Neuhof, M., Rubinstein, N. D., Diamant, A., Philippe, H., Huchon, D., Cartwright, P. (2015). Genomic insights into the evolutionary origin of Myxozoa within Cnidaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(48), 14912-14917.
- Darriba, D., Taboada, G., Doallo, R. et al. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.
- Eiras, J. C. (2002). Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Systematic Parasitology*, 52(1), 43-54.
- Eiras, J. C., Molnár, K., Lu, Y. S. (2005). Synopsis of the species of *Myxobolus* Butschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Systematic Parasitology*, 61(1), 1-46.
- Eiras, J. C., Adriano, E. (2012). A checklist of new species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2002 and 2012. *Systematic Parasitology*. 83, 95-104.
- Eiras, J. C., Zhang, J., Molnár, K. (2014). Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. *Systematic Parasitology*, 88(1), 11-36.
- Eiras, J. C., Cruz, C. F., Saraiva, A., Adriano, E. A. (2021). Synopsis of the species of *Myxobolus* (Cnidaria, Myxozoa, Myxosporea) described between 2014 and 2020. *Folia Parasitologica*, 68, 2021.012.
- Ferguson, J. A., Atkinson, S. D., Whipps, C. M, Kent, M. L. (2008). Molecular and morphological analysis of *Myxobolus* spp. of salmonid fishes with the description of a new *Myxobolus* species. *The Journal of Parasitology*, 94, 1322-13133.
- Fiala, I. (2006). The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *International Journal for Parasitology*, 36(14), 1521-1534.
- Fiala, I., Bartošová-Sojtková, P., Whipps, C. M. (2015). Classification and phylogenetics of Myxozoa. In: Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J. L. *Myxozoan evolution, ecology and development*. Cham: Springer, p. 85-110.
- Gómez, D., Bartholomew, J., Sunyer, J.O. (2014). Biology and mucosal immunity to myxozoans. *Developmental and Comparative Immunology*, 43(2), 243-256.

- Hallett, S. L., Diamant, A. (2001). Ultrastructure and small-subunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya lesteri* n. sp. (Myxosporea), a parasite of sand whiting *Sillago analis* (Sillaginidae) from the coast of Queensland. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46, 197-212.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Kent, M. L., Khattra, J., Hedrick, R. P., Devlin, R. H. (2000). *Tetracapsula renicola* n. sp. (Myxozoa: Saccosporidae), the PKX myxozoan the cause of proliferative kidney disease of salmonid fishes. *The Journal of Parasitology*, 86, 103-111.
- Kent, M. L., Andree, K. B., Bartholomew, J. L., El-Matbouli, M., Dessler, S. S., Devlin, R. H., Feist, S. W., Hedrick, R. P., Hoffmann, R. W., Khattra, J., Hallett, S. L., Lester, R. J. G., Longshaw, M., Palenzeula, O., Siddall, M. E., Xiao, C. (2001), Recent Advances in Our Knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48, 395-413.
- Liu, Y., Whipps, C.M., Gu, Z.M., Zeng, L.B. (2010). *Myxobolus turpisrotundus* (Myxosporea: Bivalvulida) spores with caudal appendages: investigating the validity of the genus *Henneguya* with morphological and molecular evidence. *Parasitology Research*, 107, 699-706.
- Lom, J., Arthur, J. R. (1989). A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *Journal of Fish Diseases*, 12(2), 151-156.
- Lom, J., Dyková, I. (1992). Fine-structure of triactinomyxon early stages and sporogony - myxosporean and actinosporean features compared. *The Journal of Protozoology*, 39,16-27.
- Lom, J., Dyková, I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica*, 53(1), 1-36.
- Lopes, D., Barbosa, T.B., Severo-Neto, F., Strietman, M. (2018). PEIXE DA VEZ - *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858. *Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia*, 126.
- Martins, M. L., Souza, V. N. (1997). *Henneguya piaractus* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae), a gill parasite of *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887

- (Osteichthyes: Characidae), in Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, 57, 239-245.
- Martins M. L., Onaka, E. M. (2006). *Henneguya garavelli* n. sp. and *Myxobolus peculiaris* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) in the gills of *Cyphocharax nagelli* (Osteichthyes: Curimatidae) from Rio do Peixe Reservoir, São José do Rio Pardo, São Paulo. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 137(3-4), 253-261.
- Mathews, P. D., Maia, A. A. M., Adriano, E. A. (2016). Morphological and ultrastructural aspects of *Myxobolus niger* n. sp. (Myxozoa) gill parasite of *Corydoras melini* (Siluriformes: Callichthyidae) from Brazilian Amazon. *Acta Tropica*, 158, 214-219.
- Milanin, T., Maia, A., Silva, M., Carriero, M., Adriano, E. (2015). Molecular phylogeny and ultrastructure of *Myxobolus* cf. *Cuneus*, a parasite of patinga hybrid and *Henneguya pseudoplatystoma*, a parasite of pintado hybrid. *Acta Parasitologica*, 60, 442-50.
- Miller, M., Pfeiffer, W. T., Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees. In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop*, 14, 1-8.
- Molnár, K., Békési, L. (1993) Description of a new *Myxobolus* species, *M. colossomatis* n. sp. from the teleost *Colossoma macropomum* of the Amazon River basin. *Journal of Applied Ichthyology*, 9, 57-63.
- Molnár, K., Eszterbauer, E., Székely, C., Dan, A., Harrach, B. (2002). Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. *Journal of Fish Diseases*, 25, 643-652.
- Morsy, K., Abdel-Ghaffar, F., Bashtar, A. R., Mehlhorn, H., Al Quraishy, S., Abdel-Gaber, R. (2012) Morphology and small subunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya suprabranchiae* (Myxozoa), a parasite of the catfish *Clarias gariepinus* (Clariidae) from the River Nile, Egypt. *Parasitology Research*, 111(4), 1423-1435.
- Naldoni, J., Arana, S., Maia, A. A., Ceccarelli, P. S., Tavares, L. E., Borges, F. A., Pozo, C. F., Adriano, E. A. (2009). *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a South American catfish: histopathology and ultrastructure. *Veterinary Parasitology*, 166(1-2), 52-59.

- Negrelli, D. C., Vieira, D. H. M. D., Tagliavini V. P., Abdallah, V. D., Azevedo, R. K. (2019). Molecular and morphological analysis of *Henneguya jundiai* n. sp. (Cnidaria: Myxosporaea), a new parasite of the gills of *Rhamdia quelen* in Brazil. *Acta Tropica*, 197, 105053.
- Nemeczek, A. (1926). Beitrage zur Kenntnis der Myxosporidien fauna Brasiliens. *Archiv für Protistenkunde*, 54, 137-149.
- Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J.L. (2015). An Introduction to Myxozoan Evolution, Ecology and Development. In: Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J. *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Springer, Cham.
- Okamura, B., Hartigan, A., Naldoni, J. (2018) Extensive Uncharted Biodiversity: The Parasite Dimension. *Integrative and Comparative Biology*, 58, 1132-1145.
- Oliveira, J.E.F., Figueredo, R.T.A., Vilhena, M.P.S.P., Berrêdo, J.F., Sindeaux-Neto, J.L., Matos, E., Velasco, M. (2020). Renal myxoboliosis of *Metynnis hypsauchen* in the Brazilian Amazon: morphological and histopathological aspects. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 42, e50267.
- Pinto, C. (1928). *Myxobolus noguchi*, *M. stokesi* e *Henneguya iheringi*, espécies novas de Myxosporídeos de peixes de água doce do Brasil. *Boletim Biológico*, 12, 41-43.
- Rambaut, A. (2014). FigTree 1.4. 2 software. Institute of Evolutionary Biology, University Edinburgh.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574.
- Sindermann, C. J. (1987). Effects of parasites on fish populations: Practical considerations. *International Journal for Parasitology*, 17(2), 371-382.
- Silva, J., Adriano, E. A., Vieira, L. J., Naldoni, J., Santos, F. (2021). The Amazonian fish *Colossoma macropomum* harbors high myxosporean diversity: A description of three novel species from a fish farm. *Microbial Pathogenesis*, 153, 104808.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Stilwell, J. M., Stilwell, N. K., Camus, A. C., Ware, C., Rosser, T. G., Griffin, M. J. (2020). Necroulcerative dermatitis associated with *Myxobolus dermatoulcerans* n. sp. (Cnidaria: Myxobolidae) in red-bellied piranha, *Pygocentrus nattereri* Kner (Characiformes: Serrasalminidae), from Peru. *Systematic Parasitology*, 97(6), 649.

- Székely, C., Cech, G., Atkinson, S. D., Molnár, K., Egyed, L., Gubányi, A. (2015). A novel myxozoan parasite of terrestrial mammals: description of *Soricimyxum minuti* sp. n. (Myxosporea) in pygmy shrew *Sorex minutus* from Hungary. *Folia Parasitologica*, 62, 2015.045.
- Úngari, L., Vieira, D. H. D., Alcantara, E., Castro, E., Santos, A., Silva, R., O'Dwyer, L. (2021). Description of a new species of myxobolid parasite, *Henneguya pindaibensis* n. sp. (Cnidaria: Myxosporea), infecting the gills of *Boulengerella cuvieri* (Spix and Agassiz, 1829) from Brazil. *Parasitology International*, 83, 102319.
- Walliker, D. (1969). Myxosporidea of some Brazilian freshwater fishes. *The Journal of Parasitology*, 55, 942-948.
- Vidal, L., Iannacone, J., Whipps, C. M., Luque, J. L. (2017). Synopsis of the species of Myxozoa Grassé, 1970 (Cnidaria: Myxosporea) in the Americas. *Neotropical Helminthology*, 11(2), 413-511.
- Vieira, D. H. M. D., Rangel, L. F., Tagliavini, V. P. et al. (2021). Morphological and molecular analysis of *Henneguya tietensis* n. sp. (Cnidaria: Myxosporea), parasitizing the gill filaments of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) from Brazil. *Parasitology Research*, 120, 27-36.
- Vieira, D., Narciso, R. B., Azevedo, R. K., da Silva, R. J. (2022a). Description of Two Novel *Henneguya* (Cnidaria: Myxosporea) Infecting Curimatid Fish, Using Morphological, Histological, and Molecular Analyses. *Acta Parasitologica*, 67(1), 233-243.
- Vieira, D. H. M. D., Narciso, R. B., Silva, R. J. (2022b). Morphological and molecular characterization of the cryptic species *Myxobolus cataractae* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa: Myxobolidae) parasitizing *Imparfinis mirini* (Siluriformes: Heptapteridae). *Parasitology International*, 88, 102560.

7. Capítulo III

***Myxobolus imparfinis* parasitando *Pimelodella avanhandavae* (Heptapteridae, Siluriformes), proveniente do rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil**

Resumo

Myxobolus imparfinis foi originalmente descrito parasitando os filamentos branquiais de *Imparfinis mirini*. O presente estudo relata um novo registro de hospedeiro (*Pimelodella avanhandavae*) e novo registro de localidade geográfica (rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil) para o parasito *M. imparfinis*. Mixoesporos de *M. imparfinis* têm $8,9\pm 0,4$ (7,9-10,0) μm de comprimento, $6,3\pm 0,3$ (5,3-6,8) μm de largura e $4,4\pm 0,2$ (4,2-4,5) μm de espessura. As cápsulas polares são alongadas e piriformes com tamanho desigual. As cápsulas polares maiores e menores, respectivamente medem $4,5\pm 0,2$ (4,1-5,1) μm e $4,2\pm 0,2$ (3,6-4,7) μm de comprimento e $1,8\pm 0,2$ (1,3-2,3) μm de largura. Cada cápsula polar tem um túbulo polar com 6-7 voltas. A sequência parcial ssrDNA de *M. imparfinis* do presente estudo exibe menos que 1,0% de diferença genética com as outras sequências de *M. imparfinis* depositadas no GenBank, correspondendo ser a mesma espécie.

Palavras-chaves: América do Sul, brânquias, Cnidaria, Myxobolidae, Myxozoa, peixe, São Paulo.

Abstract

Myxobolus imparfinis was originally described parasitizing the gill filaments of *Imparfinis mirini*. The present study reports a new record of host (*Pimelodella avanhandavae*) and new record of geographical locality (Jacaré-Guaçu River, municipality of Ibitinga, São Paulo State, Brazil) for the parasite *M. imparfinis*. Myxospores of *M. imparfinis* have 8.9 ± 0.4 (7.9-10.0) μm in length, 6.3 ± 0.3 (5.3-6.8) μm in width and 4.4 ± 0.2 (4.2-4.5) μm in thickness. The polar capsules are elongate and pyriform with uneven size. The largest and smallest polar capsules, respectively measure 4.5 ± 0.2 (4.1-5.1) μm and 4.2 ± 0.2 (3.6-4.7) μm in length and 1.8 ± 0.2 (1.3-2.3) μm in width. Each polar capsule has a polar tubule with 6-7 turns. The partial ssrDNA sequence of *M. imparfinis* from the present study exhibits less than 1.0% genetic difference with the other *M. imparfinis* sequences deposited in GenBank, corresponding to be the same species.

Keywords: Cnidaria, fish, gills, Myxobolidae, Myxozoa, São Paulo, South America,

1. Introdução

O maior grupo de parasitos de peixes dentro do filo Cnidaria Hatschek, 1888 são membros da classe Myxozoa Grassé, 1970 com cerca de 2600 espécies descritas parasitando mamíferos, répteis, anfíbios e principalmente peixes (Lom e Dyková, 2006; Fiala et al., 2015; Okamura et al., 2018). Dentro da classe Myxozoa está o gênero *Myxobolus* Bütschli, 1882 que registra aproximadamente 850 espécies em peixes dulcícolas e marinhos distribuídos em diversas regiões do mundo (Eiras et al., 2005, 2014, 2021). *Myxobolus* spp. são conhecidas por causarem patologias severas e morte em seus hospedeiros, principalmente em organismos aquáticos, como os peixes de ambiente natural ou de cultivo (Lom e Dyková, 2006; Hallett et al., 2015).

Espécies pertencentes ao gênero *Pimelodella* Eigenmann e Eigenmann, 1888 são conhecidas por fazerem parte da mesma família das espécies de bagres. Portanto, membros de *Pimelodella* compõem à família Heptapteridae e ordem Siluriformes, possuem hábito onívoro e noturno e estão distribuídos nas bacias da América do Sul e Central (Bockmann e Guazzelli, 2003). Há apenas uma espécie de *Myxobolus* registrada (*M. stokesi* (Pinto, 1928)) parasitando uma espécie não identificada correspondente ao gênero *Pimelodella*.

O objetivo principal deste estudo é relatar um novo registro de hospedeiro (*P. avanhandavae*) e um novo registro de localidade geográfica (rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil) para o mixozoário *M. imparfinis* Vieira, Tagliavini, Abdallah e Azevedo, 2018. O conjunto de análises morfológicas e moleculares com base no gene da subunidade ribossomal pequena - ssrDNA contribuem com as informações para obtenção deste novo registro.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta dos hospedeiros e processamento do mixozoário

Em maio de 2019 foi coletado um espécime de *P. avanhandavae* Eigenmann, 1917 no rio Jacaré-Guaçu (21°50'10.0"S 48°54'53.6"W), município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. O hospedeiro foi submetido à narcose que foi induzida utilizando Eugenol (óleo de cravo) e sacrificado através do método físico de secção medular com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, nº 1109 da Universidade

Estadual Paulista/UNESP. Após, o peixe foi transportado ao Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres - LAPAS, na UNESP/Botucatu, onde foi mantido congelado até o momento da necropsia.

As análises parasitológicas foram realizadas com auxílio de estereomicroscópio para verificar a presença de plasmódios e/ou cistos na superfície, brânquias e órgãos internos dos hospedeiros. As brânquias com presença de plasmódios foram separadas e os plasmódios foram retirados e montados entre lâmina e lamínula e rompidos manualmente para observação em microscópio com contraste de interferência diferencial (DIC) (Leica DMLB 5000, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

2.2. Análise morfométrica

Dados morfométricos dos mixoesporos foram obtidos em micrômetros (μm). As características analisadas foram o comprimento, largura e espessura dos mixoesporos e comprimento e largura das cápsulas polares, assim como o número de voltas dos túbulos polares. As medidas foram realizadas conforme proposto por Lom e Arthur (1989) com amplificação de $1000\times$ pelo software LAS V3.8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Os valores estão apresentados por média \pm desvio padrão e entre parênteses estão os valores menores e maiores obtidos.

2.3. Análise histológica

Fragmento das brânquias com plasmódios foi fixado em formalina 10% por 24 horas para análise histológica. A amostra foi desidratada em série de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100%) e em seguida foi banhada em Xilol (Xilol/Álcool, Xilol I, Xilol II) para diafanizar a amostra. As seguintes etapas consistiram em incluir a amostra em parafina. Após a formação dos blocos de parafina, cortes de $5\ \mu\text{m}$ foram realizados e mantidos em estufa por 24 h para secagem do material. Para coloração, a amostra foi inserida em álcool etílico em série decrescente para reidratação e em seguida foi corada com hematoxilina-eosina e observada sob microscópio de luz.

2.4. Análise molecular

Para o estudo molecular, o plasmódio contendo o mixozoário foi removido do filamento branquial e fixado em etanol 100% (Merck®). O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi extraído usando o kit Qiagen DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) a 360 nm.

As reações em cadeia de polimerase (PCR) foram realizadas com volume final de 50 µl, composto por 25 µl de 2X PCR Taq MasterMix, 3 µl de extração de DNA, 1 µl de primer forward, 1 µl de primer reverse e 20 µl de água nuclease-Free. A amplificação do *ssrDNA* foi realizada usando os pares de primers específicos para mixozoários e eucarióticos (**Tabela 1**). As condições foram constituídas por desnaturação inicial a 94°C por 3 min., seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 s, anelamento a 55°C por 40 s, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min no termociclador (Mastercycler® nexus). Os produtos das PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% em buffer TBE, corados com UniSafe Dye 0,03% (v/v) e visualizados sob luz UV. Os tamanhos dos amplicons foram estimados por comparação com 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA).

Tabela 1. Primers usados na amplificação e sequenciamento da *ssrDNA* do mixozoário. Combinação de primers: ERIB1 - ACT1r, MB5 - MX3, Myxgen4F - MX3.

Primer	Sequência 5'- 3'	Referências
ERIB1	ACCTGGTTGATCCTGCCAG	Barta et al. (1997)
ACT1r	AATTTACCTCTCGCTGCCA	Hallett e Diamant (2001)
MB5	GGTGATGATTAACAGGAGCGGT	Molnár et al. (2002)
Myxgen4F	GTGCCTTGAATAAATCAGAG	Diamant et al. (2004)
MX3	CCAGGACATCTTAGGGCATCACAGA	Andree et al. (1999)

Os produtos das PCR foram purificados usando QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., California, EUA) e foram sequenciados com os mesmos pares de primers usados nas PCR. O sequenciamento foi realizado com BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™ Inc., California, EUA) usando analisador de DNA automático por eletroforese capilar no equipamento ABI3730xl (Applied Biosystems™ Inc., California, EUA). A reação de precipitação para sequenciamento por

Etanol/EDTA/Acetato de Sódio foi realizada de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante.

As sequências obtidas foram visualizadas, editadas e montadas usando o software Geneious 7.1.3 (Kearse et al., 2012). A pesquisa no “Basic Local Alignment Search Tool” (BLASTn) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) foi realizada para verificar a similaridade genética da sequência consenso com outras sequências ssrDNA de mixozoários disponíveis no banco de dados GenBank.

A matriz de distância foi realizada a partir do alinhamento com a sequência parcial ssrDNA obtida neste estudo junto com as sequências parciais ssrDNA de *M. imparfinis* depositadas no GenBank (MF425815, MF425816 e MK491766) e *M. flavus* Carriero, Adriano, Silva, Ceccarelli e Maia, 2013 (KF296346). Tanto a similaridade, quanto a dissimilaridade genética foram obtidas usando o software Geneious 7.1.3.

3. Resultados

Apenas um espécime de *P. avanhandavae* (Siluriformes: Heptapteridae) estava com os filamentos branquiais parasitado com a espécie *M. imparfinis* (**Figura 1 A-B**).

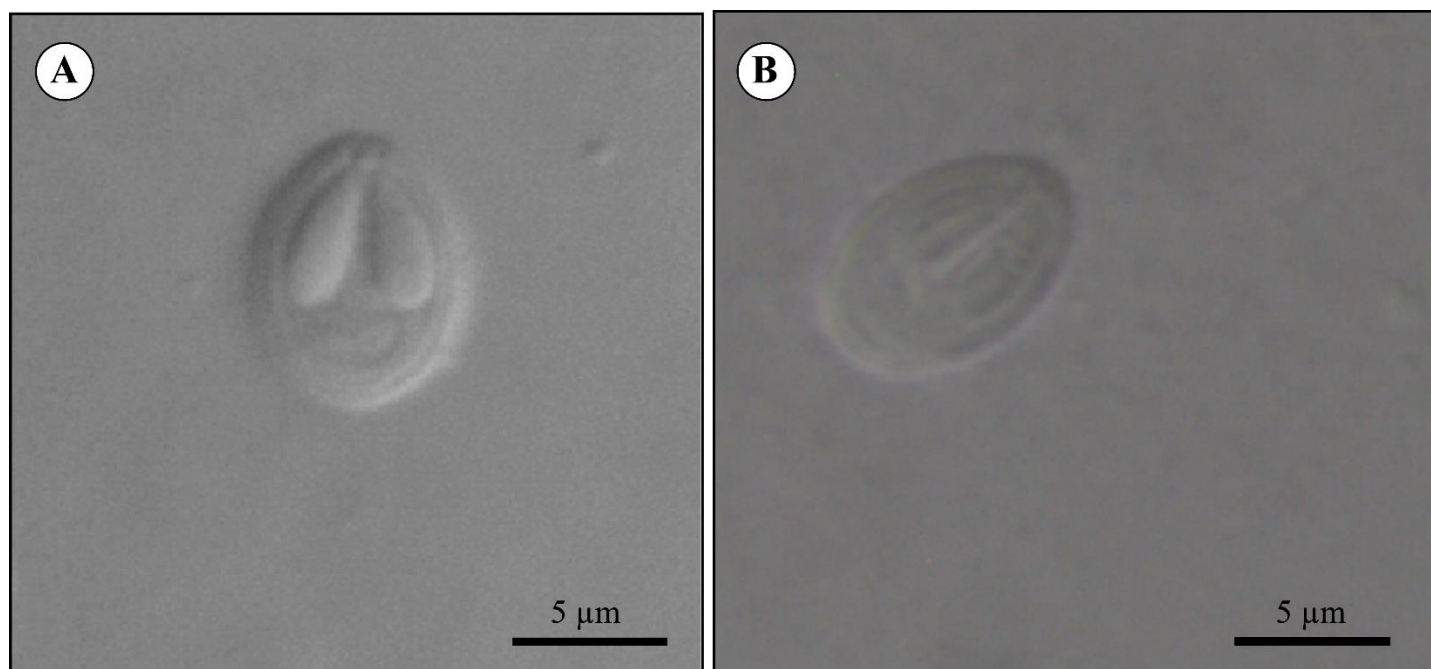


Figura 1. Fotomicrografia de mixoesporos maduros de *Myxobolus imparfinis* Vieira, Tagliavini, Abdallah e Azevedo, 2018 parasitando filamento branquial de *P. avanhandavae* Eigenmann, 1917 coletado no rio Jacaré-

Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Mixoesporo em vista frontal. **B.** Mixoesporo com túbulo polar visível, contendo de 6-7 voltas.

Mixoesporos: plasmódios estavam aderidos ao filamento branquial. Mixoesporos (n= 55) são ovais medindo $8,9\pm 0,4$ (7,9-10,0) μm de comprimento, $6,3\pm 0,3$ (5,3-6,8) μm de largura e $4,4\pm 0,2$ (4,2-4,5) μm de espessura. As cápsulas polares são alongadas e piriformes com tamanho desigual. As cápsulas polares maiores medem $4,5\pm 0,2$ (4,1-5,1) μm e as cápsulas polares menores medem $4,2\pm 0,2$ (3,6-4,7) μm de comprimento e as duas cápsulas polares têm $1,8\pm 0,2$ (1,3-2,3) μm de largura. Cada cápsula polar tem túbulo polar com 6-7 voltas.

3.1. Resumo taxonômico

Filo Cnidaria Verrill, 1865

Subfilo Endocnidozoa Schuchert, 1996

Classe Myxozoa Grassé, 1970

Subclasse Myxosporea Bütschli, 1881

Ordem Bivalvulida Shulman, 1959

Família Myxobolidae Thélohan, 1892

Gênero *Myxobolus* Bütschli, 1882

Espécie *M. imparfinis* Vieira, Tagliavini, Abdallah e Azevedo, 2018

3.2. Análise histológica

Cortes histológicos das brânquias de *P. avanhandavae* mostram que os plasmódios contendo mixoesporos de *M. imparfinis* estão associados aos vasos sanguíneos do arco branquial em sentido à artéria aferente dos filamentos branquiais (**Figura 2A**). Ocorreu o desenvolvimento de plasmódios alongados na artéria aferente dos filamentos branquiais (**Figura 2B**).

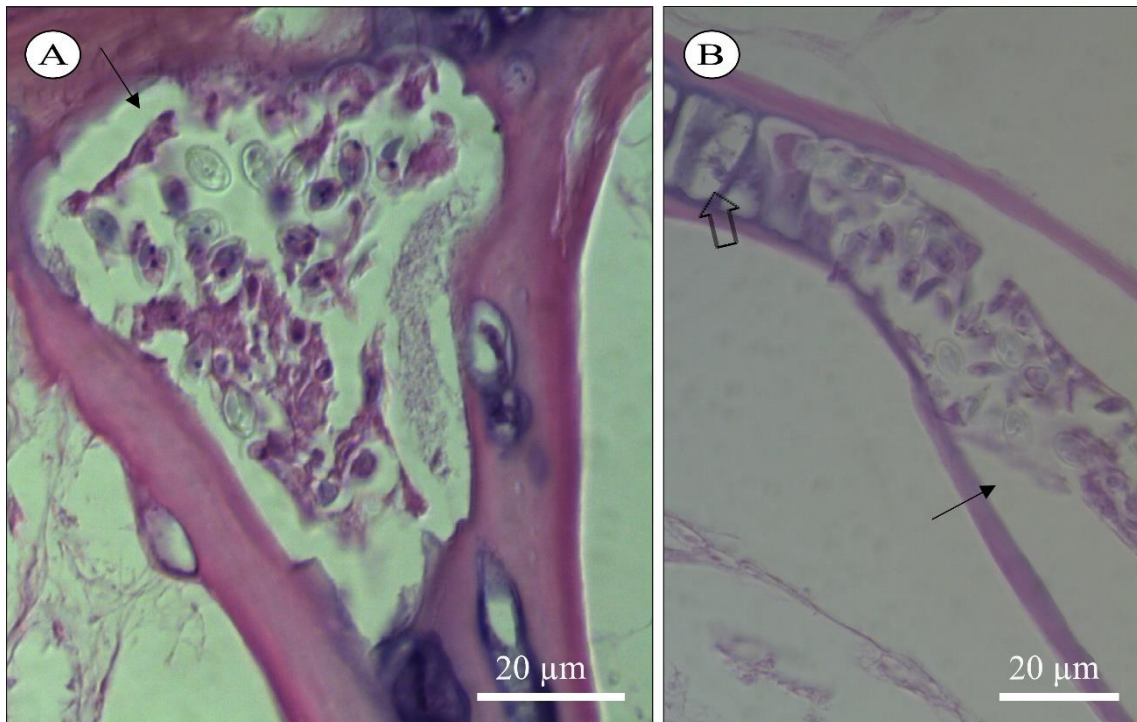


Figura 2. Fotomicrografias das secções histológicas das brânquias de *P. avanhandavae* Eigenmann, 1917 coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil com plasmódios contendo mixoesporos de *Myxobolus imparfinis* Vieira, Tagliavini, Abdallah e Azevedo, 2018. **A.** Plasmódio (seta) contendo mixoesporos de *M. imparfinis* no início da artéria branquial aferente do filamento branquial. **B.** Plasmódio (seta) no filamento branquial (seta aberta). Coloração: hematoxilina-eosina.

3.3. Análise molecular

Sequência parcial do gene *ssrDNA* com 1649 pb foi obtida para *M. imparfinis* que estava parasitando *P. avanhandavae*. A pesquisa BLASTn usando a sequência parcial *ssrDNA* mostra alta similaridade com as sequências de *M. imparfinis* disponíveis no GenBank.

Na análise de distância genética mostra que a nova sequência parcial tem similaridade genética e diferença nucleotídica de 99,9% e 1 nucleotídeo, 99,6% e 5 nucleotídeos e 99,4% e 5 nucleotídeos, respectivamente com as outras sequências de *M. imparfinis* (MF425815, MF425816, MK491766) (**Tabela 2**). Portanto, com essas informações concluímos que a sequência obtida neste estudo corresponde à espécie *M. imparfinis*.

Tabela 2. Matriz de distância genética das sequências ssrDNA de *Myxobolus* spp. Dados acima representam a porcentagem de semelhança genética e dados abaixo representam a quantidade de nucleotídeos diferentes.

	1	2	3	4	5
1 <i>Myxobolus imparfinis</i>		99.9	99.6	99.4	88.8
2 MF425815 <i>M. imparfinis</i>	1		99.7	99.5	91.0
3 MF425816 <i>M. imparfinis</i>	5	4		99.4	90.7
4 MK491766 <i>M. imparfinis</i>	5	4	5		91.1
5 KF296346 <i>M. flavus</i>	171	88	95	70	

3.4. Comentários

Mixoesporos de *M. imparfinis* encontrados no filamento branquial de *P. avanhandavae* foram comparados morfometricamente com outras 16 espécies de *Myxobolus* descritas anteriormente parasitando espécies de peixes da família Heptapteridae e ordem Siluriformes da América do Sul (**Tabela 3**). Dessa maneira *M. imparfinis* tem maior similaridade morfométrica com a espécie *M. flavus* Carriero, Adriano, Silva, Ceccarelli e Maia, 2013 parasito das brânquias de *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz) ao invés de maior similaridade com os mixoesporos de *M. imparfinis* relatados anteriormente em outros hospedeiros. Porém, as cápsulas polares dos mixoesporos de *M. imparfinis* relatado neste estudo têm tamanho desigual, característica também observada nos estudos anteriores de *M. imparfinis*. Além do mais, geneticamente, a sequência obtida para *M. imparfinis* neste estudo mostra 11,2% de diferença genética e 171 nucleotídeos diferentes quando comparado com a sequência de *M. flavus*, mostrando que são espécies distintas.

Os mixoesporos deste estudo foram comparados com *M. imparfinis* descritos anteriormente parasitando os hospedeiros *Imparfinis mirini* Haseman, 1911 e *Cetopsorhamdia iheringi* Schubart e Gomes, 1959 e mostram diferenças em algumas características morfométricas, como exemplo, os mixoesporos do presente estudo têm a largura do corpo maior (6,3 vs 5,5 vs 5,7). Mas as medidas morfométricas atuais podem ser um dado complementar a descrição original.

Tabela 3. Características morfométricas dos mixoesporos de espécies pertencentes ao gênero *Myxobolus* parasitando espécies de peixes correspondentes à família Heptapteridae e ordem Siluriformes na América do Sul. Comprimento do mixoesporo (CM), largura do mixoesporo (LM), espessura do mixoesporo (EM), comprimento das cápsulas polares (CCP), largura das cápsulas polares (LCP), ^a= representam as medidas das cápsulas polares maiores, ^b= representam as medidas das cápsulas polares menores, número de voltas do túbulo polar (TP), órgãos infectados (OI), informação ausente (-). Os valores estão representados em micrômetros (µm) e estão expressados por média ± desvio padrão. O intervalo dos valores mínimo e máximo estão entre parênteses.

Espécie	CM	LM	EM	CCP	LCP	TP	Hospedeiro	OI	Referência
<i>Myxobolus</i>				4,5±0,2					
<i>imparfinis</i> Vieira, Tagliavini, Abdallah e Azevedo, 2018	8,9±0,4 (7,9-10,0)	6,3±0,3 (5,3-6,8)	4,4±0,2 (4,2-4,5)	(4,1-5,1) ^a 4,2±0,2 (3,6-4,7) ^b	1,8±0,2 (1,3-2,3)	6-7	<i>P. avanhandavae</i> Eigenmann, 1917	Filamento branquial	Presente estudo
<i>M. imparfinis</i>	8,1 (6,6-8,8)	5,7 (5,0-6,4)	3,6 (3,5-3,8)	4,3 (3,6-4,8) ^a 3,8 (3,1-4,3) ^b	1,7 (1,4-1,9) ^a 1,5 (1,2-1,7) ^b	7-8	<i>Cetopsorhamdia</i> <i>iheringi</i> Schubart e Gomes, 1959	Filamento branquial	Franceschini et al. (2019)
<i>M. imparfinis</i>	7,9±0,3 (7,1-8,4)	5,5±0,5 (4,5-6,2)	3,7±0,3 (3,1-4,2)	3,9±0,3 (3,4-4,5) ^a 3,4±0,2 (3,1-3,8) ^b	1,7±0,1 (1,4-2,0) ^a 1,5±0,2 (1,2-1,8) ^b	6-7	<i>Imparfinis mirini</i> Haseman, 1911	Filamento branquial	Vieira et al. (2018)

<i>M. flavus</i> Carriero, Adriano, Silva, Ceccarelli e Maia, 2013	9,2±0,2	6,5±0,3	4,2±0,2	4,5±0,2	1,6±0,1	4-5	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> (Spix e Agassiz, 1829)	Arco branquial	Carriero et al. (2013)
<i>M. figueirae</i> Naldoni, Maia, Correa, da Silva e Adriano, 2018	9,5±0,3 (9,1-10,0)	6,4±0,3 (5,8-6,9)	4,5±0,1 (4,4-4,5)	4,1±0,3 (3,5-4,6) ^a 3,2±0,3 (2,4-3,6) ^b	2,1±0,3 (1,7-2,6) ^a 1,4±0,2 (1,2-2,1) ^b	7-8	<i>Phractocephalus hemioliopterus</i> (Bloch e Schneider, 1801)	Pele	Naldoni et al. (2018)
<i>M. stokesi</i> Pinto, 1928	8,5	5,3	-	3,1	1,7	-	<i>Pimelodella</i> sp.	Narina	Pinto (1928)
<i>M. sciades</i> Azevedo, Casal, Mendonça, Carvalho, Matos e Matos, 2010	9,2±0,4	4,4±0,2	2,6±0,3	4,4±0,4	1,4±0,4	9-10	<i>Sciades herzbergii</i> (Bloch, 1794)	Lamela branquial	Azevedo et al. (2010)

<i>M. adrianoi</i>										
Mathews, Madrid, Mertins, Rigoni e Morandini, 2020	22,4±0,3	16,3±0,1	-	14,3± 0,2	6,5± 0,1	5	<i>Corydoras schwartzi</i> Rössel, 1963	Intestino	Mathews et al. (2020a)	
<i>M. iquitoensis</i>										
Mathews, Meertins, Milanin, Espinoza, Flores-Gonzalez, Audebert e Morandini, 2020	17,6±1,2 (16,2-19,8)	10,5±0,7 (9,8-12,0)	-	8,7±0,4 (6,9-9,3)	3,3±0,2 (3,0-3,6)	6-7	<i>Otocinclus cocama</i> Reis, 2004	Filamento branquial	Mathews et al. (2020b)	
<i>M. tapajosi</i> Zatti, Atkinson, Maia, Corrêa, Bartholomew e Adriano, 2018	15,0 (13,5-17,0)	10,7 (9,6-11,4)	-	5,8 (4,6-7,1)	3,0 (2,3-3,8)	6-7	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> (Castelnau, 1855)	Filamento branquial	Zatti et al. (2018)	

M. marajoensis

Abrunhosa,

Sindeaux-Neto,
Santos,

10,9
(10,0-11,6) 5,1
(4,2-5,4)

-

5,3±0,6 1,6±0,4

-

Rhamdia quelen
(Quoy e Gaimard,
1824)

Intestino

Abrunhosa et al. (2017)

Hamoy e Matos,
2018

M. arariensis

Abrunhosa,

Sindeaux-Neto,
Santos,

11,4
(10,7-12,6) 7,2
(6,4-7,9).

-

4,0±0,7 1,9±0,4
(3,6-4,3) (1,7-2,2)

-

R. quelen

Musculatura

Abrunhosa et al. (2018)

Hamoy e Matos,
2018

M. niger Mathews,

Maia e
Adriano, 2016

11,3±0,4 6,8±0,2 4,1±0,2

5,0±0,3 2,0±0,1

6-7

Corydoras melini
Lönnerberg e Rendahl,
1930

Arco
branquial

Mathews et al. (2016)

<i>M. cordeiroi</i>												
Adriano, Arana, Alves, Silva, Ceccarelli, Henrique-Silva e Maia, 2009	10,8-11,3	7,1-7,5	5,2-5,6	5,2-5,4	1,4-1,5	5-6	<i>Zungaro jahu</i> (Ihering, 1898)	Brânquias, pele, bexiga urinária, serosa e olhos	Adriano et al. (2009)			
<i>M. heckelii</i>												
Azevedo, Casal, Matos, Ferreira e Matos, 2009	12,7 (12,2-13,1)	6,6 (6,3-6,9)	4,0 (3,7-4,4)	2,9 (2,7-3,3)	1,7 (1,4-2,0)	4-5	<i>Centromochlus heckelii</i> (De Filippi, 1853)	Filamento branquial	Azevedo et al. (2009)			
<i>M. absonus</i> Cellere, Cordeiro e Adriano, 2002	15,7±1,5	10,2±0,7	-	6,4±0,7 ^a 4,2±0,6 ^b	3,6±0,5 ^a 2,5±0,5 ^b	3-5	<i>Pimelodus maculatus</i> Lacepède, 1803	Cavidade opercular	Cellere et al. (2002)			
<i>M. braziliensis</i>												
Casal, Matos e Azevedo, 1996	10,2 (9,5-10,9)	5,3 (4,7-5,9)	3,7 (3,2-4,0)	5,3 (5,0-5,5)	1,4 (1,4-1,4)	9-10	<i>Bunocephalus coracoideus</i> (Cope, 1874)	Lamela branquial	Casal et al. (1996)			

4. Discussão

Mixozoários são conhecidos pelo certo grau de especificidade ao hospedeiro (Lom e Dyková, 2006). Embora, observamos que *M. imparfinis* foi transmitido para espécies de peixes de diferentes gêneros.

Originalmente *M. imparfinis* foi descrito em *I. mirini*, espécie pertencente a família Heptapteridae e ordem Siluriformes, coletada no rio Batalha, Bacia do Alto Rio Paraná, município de Agudos, estado de São Paulo, Brasil. Franceschini et al. (2019) também relataram *M. imparfinis* em *C. iheringi*, espécie filogeneticamente próxima de *I. mirini*, coletada nos riachos do rio Médio Paranapanema, Bacia do Alto Rio Paraná, estado de São Paulo, Brasil.

De fato, *M. imparfinis* está parasitando a terceira espécie hospedeira, e essa situação pode ter ocorrido devido as espécies de peixes que são filogeneticamente próximas e podem compartilhar as mesmas espécies de parasitos (Molnár e Békési, 1993; Molnár, 1998). Assim como, infecções da mesma espécie de parasito em hospedeiros e localidades diferentes podem ocorrer pelas hipóteses de hospedeiros migratórios como os peixes e as aves aquáticas (Hallett et al., 2015).

Informações moleculares mostram que a presente espécie corresponde a *M. imparfinis*. Enquanto que a morfometria mostra algumas diferenças entre os mixoesporos de *M. imparfinis* coletado em *P. avanhandavae* em relação aos mixoesporos também de *M. imparfinis* coletados em *I. mirini* e *C. iheringi*.

Como visto na análise morfométrica, *M. imparfinis* tem maior similaridade com a espécie *M. flavus*. Essa alteração na morfometria pode estar relacionada com a mudança de hospedeiro, assim como ocorre com algumas espécies pertencentes ao gênero *Hepatozoon* Miller, 1908, ou seja, quando uma mesma espécie de parasito está em espécies de hospedeiros diferentes pode ter alteração nas características morfológicas e morfométricas (Ball, 1967; Smith, 1996). Conforme essas informações anteriores, observamos a importância das análises moleculares, pois este presente estudo se trata de uma espécie críptica, no qual tem maior similaridade morfométrica com *M. flavus*, mas geneticamente corresponde a *M. imparfinis*.

Conforme a descrição de *M. imparfinis* por Vieira et al. (2018) e Franceschini et al. (2019) os mixoesporos são observados em grupos e também dispersos na artéria aferente do filamento das brânquias dos hospedeiros. Molnár (2002) já havia relatado que o desenvolvimento de plasmódios nos filamentos branquiais é muito comum por

infecções de mixozoários principalmente em relação às espécies de *Myxobolus*. Sendo assim, de acordo com Molnár (2002), Vieira et al. (2018) e Franceschini et al. (2019) a infecção é do tipo filamentar e subtipo vascular.

Este estudo corresponde o registro de *M. imparfinis* parasitando uma terceira espécie de peixe (*P. avanhandavae*) e também o registro desse mixozoário em nova localidade geográfica (rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil). Portanto, esse relato é essencial para mostrar a distribuição e interação de hospedeiros filogeneticamente próximos e seus parasitos.

5. Referências

- Abrunhosa, J., Sindeaux-Neto, J. L., Santos, Â., Hamoy, I., Matos, E. (2017). *Myxobolus marajoensis* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae), parasite of the freshwater catfish *Rhamdia quelen* from the Brazilian Amazon region. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26(4), 465-471.
- Abrunhosa, J., Sindeaux-Neto, J. L., Santos, S., Hamoy, I., Matos, E. (2018). A new species of myxozoa in the skeletal striated musculature of *Rhamdia quelen* (Quoy Gaimard) (Siluriforme: Pimelodidae) Amazonian fish, Marajó island, Brazil. *Zootaxa*, 4482(1), 164-176.
- Adriano, E. A., Arana, S., Alves, A. L., Silva, M. R., Ceccarelli, P. S., Henrique-Silva, F., Maia, A. A. (2009). *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: morphology, phylogeny and histopathology. *Veterinary Parasitology*, 162(3-4), 221-229.
- Andree, K. B., Székely, C., Molnár, K., Gresoviac, S. J., Hedrick, R. P. (1999). Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bilvalvidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences. *Journal of Parasitology*, 85, 68-74.
- Azevedo, C., Casal, G., Matos, P., Ferreira, I., Matos, E. (2009). Light and Electron Microscopy of the Spore of *Myxobolus heckelii* n. sp. (Myxozoa), Parasite from the Brazilian Fish *Centromochlus heckelii* (Teleostei, Auchenipteridae). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56, 589-593.
- Azevedo, C., Casal, G., Mendonça, I., Carvalho, E., Matos, P., Matos, E. (2010). Light and electron microscopy of *Myxobolus sciades* n. sp. (Myxozoa), a parasite of the gills of the Brazilian fish *Sciades herzbergii* (Block, 1794) (Teleostei: Ariidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2), 203-207.
- Ball, H. G. (1967). Some Blood Sporozoans from East African Reptiles., 14(2), 198-210.
- Barta, J. R., Martin, D. S., Liberator, P. A., Dashkevich, M., Anderson, J. W., Feigner, S.D., et al. (1997). Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *Journal of Parasitology*, 83, 262-271.
- Bockmann, F.A., Guazzelli, G.M. (2003). Heptapteridae (Heptapterids). In: Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris, C. J. Jr. *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil. p. 406-431.

- Carriero, M. M., Adriano, E. A., Silva, M. R., Ceccarelli, P. S., Maia, A. A. (2013). Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. *PLoS One*, 8(9), e73713.
- Casal, G., Matos, E., Azevedo, C. (1996). Ultrastructural data on the life cycle stages of *Myxobolus brasiliensis* n. sp., parasite of an Amazonian fish. *European Journal of Protistology*, 32, 12-127.
- Cellere, E. F., Cordeiro, N. S., Adriano, E. A. (2002). *Myxobolus absonus* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea) parasitizing *Pimelodus maculatus* (siluriformes: Pimelodidae), a South American freshwater fish. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(1), 79-80.
- Diamant, A., Whipps, C.M., Kent, M.L. (2004). A new species of *Sphaeromyxa* (Myxosporea: Sphaeromyxina: Sphaeromyxidae) in devil fire fish, *Pterois miles* (Scorpaenidae), from the northern Red Sea: Morphology, ultrastructure, and phylogeny. *The Journal of Parasitology*, 90, 1434-1442.
- Eiras, J. C., Molnár, K., Lu, Y. S. (2005). Synopsis of the species of *Myxobolus* Butschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Systematic Parasitology*, 61(1), 1-46.
- Eiras, J. C., Zhang, J., Molnár, K. (2014). Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. *Systematic Parasitology*, 88(1), 11-36.
- Eiras, J. C., Cruz, C. F., Saraiva, A., Adriano, E. A. (2021). Synopsis of the species of *Myxobolus* (Cnidaria, Myxozoa, Myxosporea) described between 2014 and 2020. *Folia Parasitologica*, 68, 2021.012.
- Fiala, I., Bartošová-Sojtková, P., Whipps C.M. (2015). Classification and phylogenetics of Myxozoa. In: *Myxozoan evolution, ecology and development*. Cham: Springer, 85-110.
- Franceschini, L., Vieira, D., Zago, A. C., Azevedo, R. K., Abdallah, V. D., da Silva, R. J. (2019). New data on *Myxobolus imparfinis* (Cnidaria, Myxosporea): host, distribution, and ultrastructural morphology. *Parasitology Research*, 118(6), 1967-1973.
- Hallett, S. L., Diamant, A. (2001). Ultrastructure and small-subunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya lesteri* n. sp (Myxosporea), a parasite of sand whiting *Sillago analis* (Sillaginidae) from the coast of Queensland, Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46, 197-212.

- Hallett, S. L.; Atkinson, S. D.; Bartholomew, J. L.; Székely, C. (2015). Myxozoans exploiting homeotherms. In: Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J.L. *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Budapest: Springer, p.125-135.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A. (2012). Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647-1649.
- Lom, J., Arthur, J. R. (1989). A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *Journal of Fish Diseases*, 12(2), 151-156.
- Lom, J., Dyková, I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica*, 53(1), 1-36.
- Mathews, P. D., Maia, A., Adriano, E. A. (2016). Morphological and ultrastructural aspects of *Myxobolus niger* n. sp. (Myxozoa) gill parasite of *Corydoras melini* (Siluriformes: Callichthyidae) from Brazilian Amazon. *Acta Tropica*, 158, 214-219.
- Mathews, P., Madrid, R., Mertins, O., Rigoni, V., Morandini, A. (2020a). A new *Myxobolus* (Cnidaria: Myxosporea) infecting the ornamental catfish *Corydoras schwartzi* from the Purus River in Brazil. *European Journal of Taxonomy*, 620, 1-14.
- Mathews, P. D., Mertins, O., Milanin, T., Espinoza, L. L., Flores-Gonzales, A. P., Audebert, F., Morandini, A. C. (2020b). Molecular Phylogeny and taxonomy of a new *Myxobolus* species from the endangered ornamental fish, *Otocinclus cocama* endemic to Peru: A host-parasite coextinction approach. *Acta Tropica*, 210, 105545.
- Molnár, K. (1998). Taxonomic problems, seasonality and histopathology of *Henneguya creplini* (Myxosporea) infection of the pikeperch *Stizostedion lucioperca* in Lake Balaton. *Folia Parasitologica*, 45, 261-269.
- Molnár, K. (2002). Site preference of fish myxosporeans in the gill. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48(3), 197-207.
- Molnár, K., Békési, L. (1993) Description of a new *Myxobolus* species, *M. colossomatis* n. sp. from the teleost *Colossoma macropomum* of the Amazon River basin. *Journal of Applied Ichthyology*, 9, 57-63.

- Molnár, K., Eszterbauer, E., Székely, C., Dan, A., Harrach, B. (2002). Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. *Journal of Fish Diseases*, 25, 643-652.
- Naldoni, J., Maia, A., Correa, L. L., Silva, M., Adriano, E. A. (2018). New myxosporeans parasitizing *Phractocephalus hemioliopus* from Brazil: morphology, ultrastructure and SSU-rDNA sequencing. *Diseases of Aquatic Organisms*, 128(1), 37-49.
- Okamura, B., Hartigan, A., Naldoni, J. (2018). Extensive Uncharted Biodiversity: The Parasite Dimension. *Integrative and Comparative Biology*, 58(6), 1132-1145.
- Pinto, C. (1928). *Myxobolus noguchii*, *M. stokesi* e *Henneguya iheringi*, especies novas de Myxosporídeos de peixes de água doce do Brasil. *Boletim Biológico*, 12, 41-43.
- Smith, T. G. (1996). The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *The Journal of Parasitology*, 82(4), 565-585.
- Vieira, D., Tagliavini, V. P., Abdallah, V. D., de Azevedo, R. K. (2018). *Myxobolus imparfinis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporidia), a new gill parasite of *Imparfinis mirini* Haseman (Siluriformes: Heptapteridae) in Brazil. *Systematic Parasitology*, 95(2-3), 309-318.
- Zatti, S. A., Atkinson, S. D., Maia, A., Corrêa, L. L., Bartholomew, J. L., Adriano, E. A. (2018). Novel *Myxobolus* and *Ellipsomyxa* species (Cnidaria: Myxozoa) parasitizing *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin, Brazil. *Parasitology International*, 67(5), 612-621.

8. Capítulo IV

Caracterização morfológica e filogenética de novas espécies de mixozoários (Myxobolidae, Cnidaria) parasitos de *Pimelodella gracilis* Valenciennes, 1835 (Heptapteridae: Siluriformes) coletados no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil

Resumo

Foram realizadas análises morfológicas e filogenéticas das novas espécies de *Myxobolus* e *Henneguya* parasitos do peixe de água doce *Pimelodella gracilis* proveniente do rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, interior do estado de São Paulo, Brasil. Os plasmódios contendo mixoesporos de *Myxobolus* n. sp. 3 foram encontrados na musculatura do arco branquial, *Myxobolus* n. sp. 4 foi coletado das nadadeiras caudal e peitoral e barbilhão, *Myxobolus* n. sp. 5 foi encontrado no arco branquial e *Henneguya* n. sp. 5 foi coletada parasitando as lamelas branquiais. Alguns mixoesporos de *Myxobolus* n. sp. 3 e *Myxobolus* n. sp. 4 têm a presença de apêndices caudais. As análises filogenéticas com algumas espécies dos gêneros *Myxobolus*, *Henneguya* e *Thelohanellus* mostram que *Myxobolus* n. sp. 3 e *Myxobolus* n. sp. 4 estão agrupados no subclado composto pelas espécies *M. prochilodus*, *M. curimatae*, *M. iarakiensis* e *M. porofilus* que parasitam espécies de peixes da ordem Characiformes e *Myxobolus* n. sp. 5 está alocada sozinha, neste mesmo subclado. Este é o primeiro registro das espécies correspondentes aos gêneros *Myxobolus* e *Henneguya* parasitando o hospedeiro *P. gracilis*.

Palavras-chaves: América do Sul, barbilhão, brânquias, *Henneguya*, *Myxobolus*, Myxosporea, nadadeira, peixe, São Paulo.

Abstract

We performed morphological and phylogenetic analyses of the new species of *Myxobolus* and *Henneguya* parasites of the freshwater fish *Pimelodella gracilis* from the Jacaré-Guaçu River, municipality of Ibitinga, interior of the state of São Paulo, Brazil. Plasmodium containing myxospores of *Myxobolus* n. sp. 3 were found in the musculature of the gill arch, *Myxobolus* n. sp. 4 was collected from the caudal and pectoral fins and wattle, *Myxobolus* n. sp. 5 was found in the gill arch and *Henneguya* n. sp. 5 was collected parasitizing the gill lamellae. Some myxospores of *Myxobolus* n. sp. 3 and *Myxobolus* n. sp. 4 have the presence of caudal appendages. Phylogenetic analyses with some species of the genera *Myxobolus*, *Henneguya* and *Thelohanellus* show that *Myxobolus* n. sp. 3 and *Myxobolus* n. sp. 4 are grouped in the subclade composed of the species *M. prochilodus*, *M. curimatae*, *M. iarakiensis* and *M. porofilus* that parasitize fish species of the order Characiformes and *Myxobolus* n. sp. 5 is allocated alone in this same subclade. This is the first record of species corresponding to the genera *Myxobolus* and *Henneguya* parasitizing the host *P. gracilis*.

Keywords: Fin, fish, gills, *Henneguya*, *Myxobolus*, Myxosporea, São Paulo, South America, wattle.

1. Introdução

Mixozoários pertencem aos cnidários e são endoparasitos de hospedeiros vertebrados e invertebrados com fase mixosporea e actinosporea, respectivamente, para completar o ciclo de vida (Lom e Dyková, 2006; Bartholomew et al., 2008; Okamura et al., 2015; Atkinson et al., 2018). Como características principais, os mixozoários têm cápsulas polares e túbulo polar que são usados no momento de alcançar o hospedeiro alvo (Kent et al., 2001; Canning e Okamura, 2004; Feist e Longshaw, 2006; Lom e Dyková, 2006).

Espécies representantes dos gêneros *Myxobolus* Bütschli, 1882 e *Henneguya* Thélohan, 1892 pertencem a família Myxobolidae Thélohan, 1892 e são os mais diversos com aproximadamente 850 espécies de *Myxobolus* e em torno de 200 espécies de *Henneguya* descritas parasitando peixes de água doce e marinhos (Eiras, 2002; Eiras et al., 2005, 2014, 2021; Eiras e Adriano, 2012). Mixozoários podem causar sérias doenças em peixes e, conseqüentemente, podem gerar diversos prejuízos, principalmente econômicos (Barassa et al., 2003; Naldoni et al., 2009; Morsy et al., 2012; Gómez et al., 2014).

Algumas espécies de *Henneguya* são conhecidas por causarem doenças principalmente nas brânquias dos peixes, comprometendo a função respiratória (Pote et al., 2000; Griffin et al., 2009; Adriano et al., 2012; Naldoni et al., 2014; Figueredo et al., 2020). Assim como, algumas espécies de *Myxobolus* podem causar doenças em seus hospedeiros, como exemplo, *M. cerebralis* Hofer, 1903 que tem o potencial de causar a grave doença do rodopio ou "whirling disease" em peixes salmonídeos (Andree et al., 1997).

Pimelodella gracilis Valenciennes, 1835 é membro da família Heptapteridae e ordem Siluriformes e está distribuído nas bacias da América do Sul, sendo que no Brasil pode ser encontrado em diversas regiões, incluindo os rios pertencentes ao estado de São Paulo (Bockmann e Guazzelli, 2003). No Brasil essa espécie é conhecida como "mandizinho", possui hábito onívoro com tendência herbívora e é ativo principalmente ao anoitecer (Mills e Vevers, 1989; Bockmann e Guazzelli, 2003).

Não há registro de espécies de *Myxobolus* e *Henneguya* parasitando *P. gracilis*, há apenas o registro de uma espécie de *Myxobolus* (*M. stokesi* Pinto, 1928) parasitando *Pimelodella* sp. Portanto, o presente estudo tem como objetivo descrever o parasitismo por novas espécies de *Myxobolus* infectando as brânquias, nadadeiras e barbilhão e uma

espécie de *Henneguya* infectando as brânquias dos espécimes de *P. gracilis* coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil com base na morfologia dos mixoesporos e informações moleculares do gene da subunidade ribossomal pequena - ssrDNA.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta dos hospedeiros e processamento morfológico dos mixozoários

Quarenta e seis espécimes de *P. gracilis* foram coletados durante agosto de 2018 e maio de 2019 com auxílio de rede de pesca no rio Jacaré-Guaçu (21°50'10.0"S 48°54'53.6"W), município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. Os peixes foram submetidos à narcose que foi induzida utilizando Eugenol (óleo de cravo) e sacrificados através do método físico de secção medular com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA (n° 1109) da Universidade Estadual Paulista/UNESP. Em seguida, os peixes foram enviados para o Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (LAPAS) na UNESP/Botucatu onde foram mantidos congelados em freezer até o momento da necropsia.

As análises parasitológicas foram realizadas com auxílio de estereomicroscópio para verificar a presença de plasmódios e/ou cistos na superfície, brânquias e órgãos internos dos hospedeiros. Os órgãos parasitados foram separados e os plasmódios foram retirados e montados entre lâmina e lamínula, rompidos manualmente e analisados em microscópio com contraste de interferência diferencial (DIC) (Leica DMLB 5000, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

Dados morfométricos dos mixoesporos foram obtidos em micrômetros (μm) seguindo as orientações de Lom e Arthur (1989) com amplificação de 1000 \times e fotomicrografias foram obtidas pelo software LAS V 3.8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Os valores estão apresentados por média \pm desvio padrão e entre parênteses estão os valores menores e maiores obtidos. A prevalência de infecção foi calculada de acordo com Bush et al. (1997).

2.2. Análise molecular

Plasmódios contendo espécies de mixozoários foram fixados em etanol 100% (Merck®). O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi extraído usando o kit Qiagen DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante e após foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) a 360 nm.

Reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada para amplificação do *ssrDNA* de *Myxobolus* n. sp. 3. A PCR foi composta por 25 µl de 2X PCR Taq MasterMix, 3 µl de extração de DNA, 1 µl de primer forward, 1 µl de primer reverse e 20 µl de água nuclease-Free completando o volume final de 50 µl. Foram usados os primers ERIB1 e ACT1r (Barta et al., 1997; Hallett e Diamant, 2001) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 s, anelamento a 55°C por 40 s, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min no termociclador (Mastercycler® nexus).

Duas PCR foram realizadas para amplificação do *ssrDNA* de *Myxobolus* n. sp. 4 contendo 25 µl de 2X PCR Taq MasterMix, 3 µl de extração de DNA, 1 µl de primer forward, 1 µl de primer reverse e 20 µl de água nuclease-Free completando o volume final de 50 µl. Foram usados o conjunto de primers MX5 e MX3 (Andree et al., 1999) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 s, anelamento a 55°C por 40 s, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min no termociclador (Mastercycler® nexus). Além do mais, para amplificação *ssrDNA* desta mesma espécie, a PCR foi realizada usando esferas puReTaq Ready-to-Go beads (PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads, Global Life Sciences, Reino Unido) contendo ~ 2,5 unidades de DNA polimerase PuReTaq recombinante, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, estabilizadores, BSA e tampão de reação obtendo o volume final de 25 µl com 3 µl de extração de DNA, 1 µl de primer forward, 1 µl de primer reverse e completado com água nuclease-Free. A PCR foi realizada com os primers 18E e ERIB10 (Hillis e Dixon, 1991; Barta et al., 1997) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C por 1 min, anelamento a 53°C por 45 s, extensão a 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 7 min. usando também o termociclador (Mastercycler® nexus).

Para amplificação *ssrDNA* de *Myxobolus* n. sp. 5 foi realizada a PCR usando esferas de puReTaq Ready-to-Go beads (PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads, Global Life Sciences, Reino Unido) contendo ~ 2,5 unidades de DNA polimerase PuReTaq recombinante, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, estabilizadores, BSA e tampão de reação

obtendo o volume final de 25 µl com 3 µl de extração de DNA, 1 µl de primer forward, 1 µl de primer reverse e completado com água nuclease-Free. A PCR foi realizada com os primers ERIB1 e ACT1r (Barta et al., 1997; Hallett e Diamant, 2001) no termociclador (Mastercycler® nexus) com desnaturação inicial a 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C por 1 min, anelamento a 58°C por 45 s, extensão a 72°C por 2 min e extensão final a 72°C por 7 min.

Os produtos das PCR geradas foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados com UniSafe Dye 0,03% (v/v) e visualizadas sob luz UV. Os produtos das PCR foram purificados usando QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., California, EUA) e foram sequenciados com os mesmos pares de primers usados nas PCR. O sequenciamento foi realizado com BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™ Inc., California, EUA) usando analisador de DNA automático por eletroforese capilar no equipamento ABI3730xl (Applied Biosystems™ Inc., California, EUA). A reação de precipitação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio foi realizada de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante.

2.3. Análise filogenética das espécies de *Myxobolus*

As sequências obtidas foram visualizadas, editadas e montadas usando o software Geneious 7.1.3 (Kearse et al., 2012). As sequências consenso geradas foram enviadas ao “Basic Local Alignment Search Tool” (BLASTn) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) para verificar a similaridade genética das novas espécies com outras espécies de mixozoários disponíveis no GenBank.

As sequências parciais das novas espécies de *Myxobolus* com outras 64 sequências ssrDNA de espécies de mixozoários dos gêneros *Myxobolus*, *Henneguya* e *Thelohanellus* mais próximos as novas espécies obtidas da pesquisa BLASTn com >80% de similaridade e o outgroup *Ceratomyxa amazonensis* Mathews, Naldoni, Maia, Adrino, 2016 (KX236169) foram alinhados no software Geneious 7.1.3 usando o algoritmo MUSCLE.

As análises filogenéticas foram realizadas usando maximum likelihood (ML) e inferência Bayesiana (IB). A análise ML foi realizada no software RAxML-HPC v.8 on XSEDE 8.2.12 (Stamatakis, 2014) com topologia avaliada por bootstrap com 1000 replicações. A análise IB foi realizada usando o software MrBayes on XSEDE 3.2.7a (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) com probabilidade posterior estimada por 10 milhões de gerações com duas corridas paralelas de quatro cadeias simultâneas usando o algoritmo

Markov Chain Monte Carlo (MCMC). O burn-in foi de 10%. O melhor modelo evolucionário (GTR + G + I) foi selecionado usando jModelTest2 on XSEDE (Darriba et al., 2012) conforme o critério de informação Akaike (AIC). As análises feitas pelo jModelTest2, MrBayes e RAxML foram geradas pelo servidor CIPRES (Miller et al., 2010). As árvores geradas foram visualizadas usando FigTree 1.4.4 (Rambaut, 2014) e editadas no Adobe Illustrator 24.0.

3. Resultados

Entre os 46 espécimes de *P. gracilis* analisados, cinco (10,9%) espécimes estavam parasitados com mixozoários. Destes cinco espécimes, quatro espécimes estavam parasitados com *Myxobolus* spp. e um espécime estava parasitado com *Henneguya* sp.

Sendo que, um espécime tinha *Myxobolus* n. sp. 3 na musculatura do arco branquial, dois espécimes tinham *Myxobolus* n. sp. 4 nas nadadeiras caudal e peitoral e barbilhão simultaneamente, um espécime tinha *Myxobolus* n. sp. 5 no arco branquial e um espécime tinha *Henneguya* n. sp. 5 nas lamelas branquiais.

3.1. Resumo taxonômico

Filo Cnidaria Verrill, 1865

Subfilo Endocnidozoa Schuchert, 1996

Classe Myxozoa Grassé, 1970

Subclasse Myxosporea Bütschli, 1881

Ordem Bivalvulida Shulman, 1959

Família Myxobolidae Thélohan, 1892

Gênero *Myxobolus* Bütschli, 1882

Espécie *Myxobolus* n. sp. 3 (**Figura 1 A-B**)

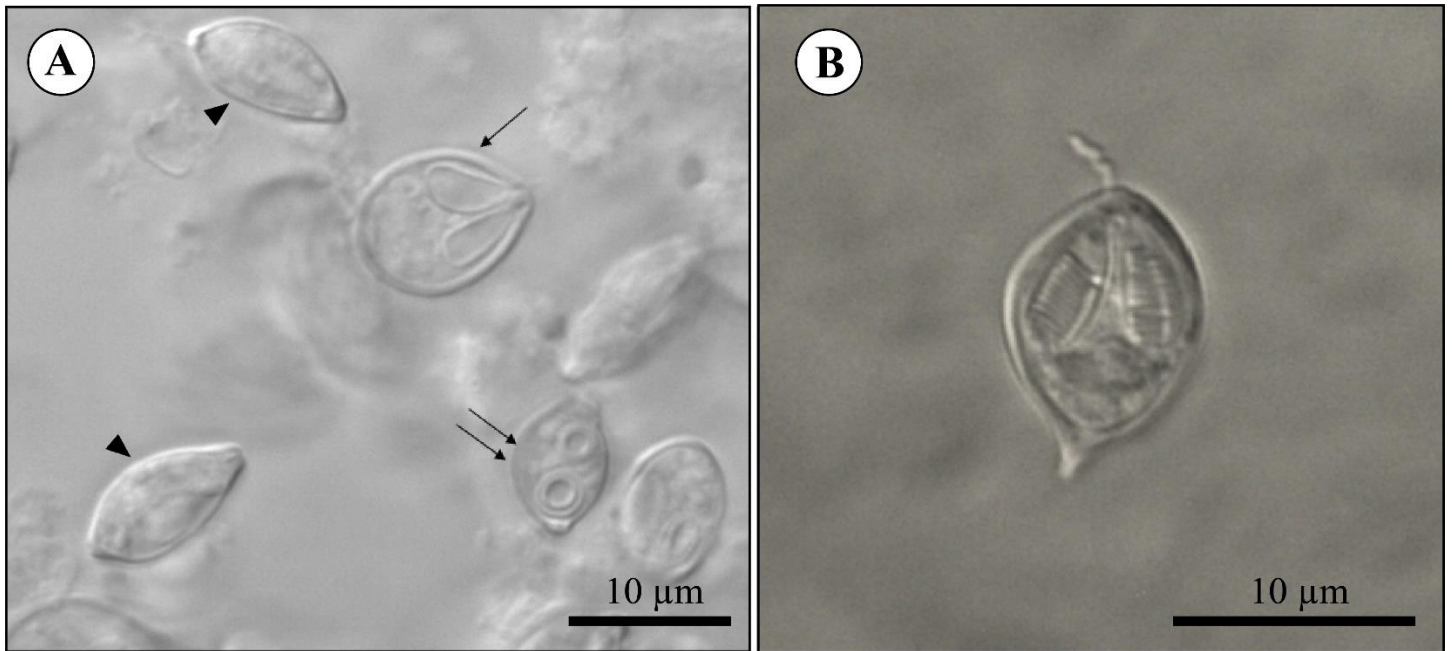


Figura 1. Fotomicrografia de mixoesporos maduros de *Myxobolus* n. sp. 3 parasitando a musculatura do arco branquial do hospedeiro *Pimelodella gracilis* Valenciennes, 1835 coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Mixoesporo em vista frontal (seta), em vista lateral (ponta de seta) e apical (duas setas) de *Myxobolus* n. sp. 3. **B.** Mixoesporo de *Myxobolus* n. sp. 3 em vista frontal com a presença de apêndice caudal. Observe o túbulo polar com 8-9 voltas dentro das cápsulas polares.

Hospedeiro-tipo: *Pimelodella gracilis* Valenciennes, 1835 (Siluriformes: Heptapteridae).

Localidade-tipo: rio Jacaré-Guaçu (21°50'10.0"S 48°54'53.6"W), município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil.

Localidade no hospedeiro: plasmódios na musculatura do arco branquial.

Prevalência: 2,2% (1 de 46 peixes analisados estava parasitado).

Descrição: plasmódios foram encontrados na musculatura do arco branquial assim que aberto o opérculo para retirada das brânquias. Os plasmódios apresentaram coloração esbranquiçada com membrana transparente ao redor. Os mixoesporos (n= 109) maduros coletados da musculatura do arco branquial são bastante arredondados na parte posterior e piriformes na parte anterior e têm $11,7 \pm 0,7$ (10,1-13,7) μm de comprimento, $8,3 \pm 0,5$ (7,4-9,6) μm de largura e $6,0 \pm 0,4$ (5,2-6,5) μm de espessura. Alguns mixoesporos têm a presença de apêndice caudal. As cápsulas polares têm tamanho igual e formato alongado piriforme, medindo $6,0 \pm 0,5$ (5,0-7,1) μm de comprimento e $2,5 \pm 0,3$ (2,1-3,2) μm de largura e ocupam mais que a metade do corpo do mixoesporo. O túbulo polar dos mixoesporos têm de 8-9 voltas.

3.2. Resumo taxonômico

Filo Cnidaria Verrill, 1865

Subfilo Endocnidozoa Schuchert, 1996

Classe Myxozoa Grassé, 1970

Subclasse Myxosporea Bütschli, 1881

Ordem Bivalvulida Shulman, 1959

Família Myxobolidae Thélohan, 1892

Gênero *Myxobolus* Bütschli, 1882

Espécie *Myxobolus* n. sp. 4 (**Figura 2 A-B**)

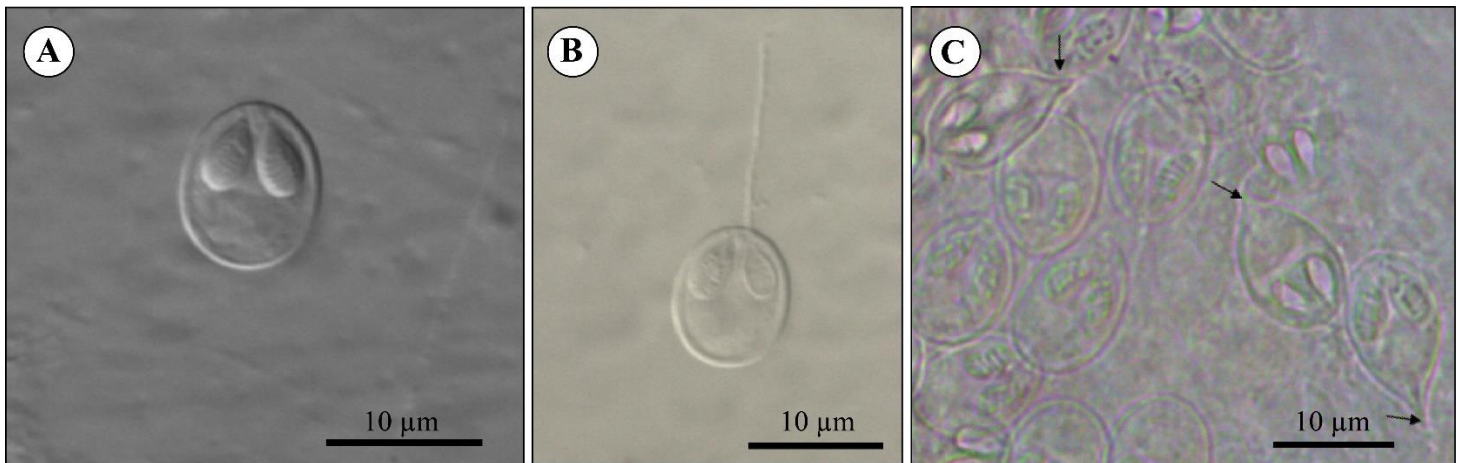


Figura 2. Fotomicrografia de mixoesporos maduros de *Myxobolus* n. sp. 4 parasitando *Pimelodella gracilis* Valenciennes, 1835 coletados no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Mixoesporo de *Myxobolus* n. sp. 4 em vista frontal coletado da nadadeira caudal. **B.** Mixoesporo de *Myxobolus* n. sp. 4 em vista frontal coletado do barbilhão com o túbulo polar direito extrudado. **C.** Mixoesporos de *Myxobolus* n. sp. 4 coletados da nadadeira peitoral com presença de apêndices caudais (setas).

Hospedeiro-tipo: *Pimelodella gracilis* Valenciennes, 1835 (Siluriformes: Heptapteridae).

Localidade-tipo: rio Jacaré-Guaçu (21°50'10.0"S 48°54'53.6"W), município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil.

Localidade no hospedeiro: plasmódios encistados nas nadadeiras caudal e peitoral e barbilhão.

Prevalência: 4,3% (2 de 46 peixes analisados estavam parasitados).

Descrição: diversos plasmódios agrupados eram transparentes com massa branca no interior. Mixoesporos das nadadeiras caudal (n= 34) e peitoral (n= 31) e barbilhão (n= 10) têm formato arredondado e medem $12,0\pm 0,4$ (11,5-12,9), $11,9\pm 0,4$ (11,0-12,8) e $11,5\pm 0,4$ (11,0-12,2) μm , respectivamente de comprimento, $8,7\pm 0,4$ (8,0-9,8), $8,6\pm 0,3$ (8,1-9,2) e $7,8\pm 0,5$ (7,2-8,8) μm , respectivamente de largura e $5,9\pm 0,5$ (4,9-6,8) μm de espessura. As cápsulas polares com tamanho igual são arredondadas e piriformes medindo $5,5\pm 0,3$ (4,7-6,1), $5,3\pm 0,4$ (4,5-6,2) e $4,4\pm 0,4$ (3,8-5,2) μm , respectivamente de comprimento e $2,7\pm 0,3$ (2,2-3,6), $2,7\pm 0,2$ (2,0-3,0) e $2,2\pm 0,2$ (1,9-2,6) μm , respectivamente de largura e ocupam menos que a metade do corpo dos mixoesporos. Alguns mixoesporos também têm a presença de apêndice caudal. O túbulo polar dos mixoesporos oriundos dos três órgãos parasitados têm de 5-6 voltas. Observação: todas as cápsulas polares dos mixoesporos coletados do barbilhão estavam com o túbulo polar extrudado, portanto, uma das cápsulas polares tem o comprimento menor, característica que pode ser observada na **Figura 2B**.

3.3. Resumo taxonômico

Filo Cnidaria Verrill, 1865

Subfilo Endocnidozoa Schuchert, 1996

Classe Myxozoa Grassé, 1970

Subclasse Myxosporea Bütschli, 1881

Ordem Bivalvulida Shulman, 1959

Família Myxobolidae Thélohan, 1892

Gênero *Myxobolus* Bütschli, 1882

Espécie *Myxobolus* n. sp. 5 (**Figura 3**)



Figura 3. Fotomicrografia de mixoesporos maduros de *Myxobolus* n. sp. 5 que estavam parasitando o arco branquial de *Pimelodella gracilis* Valenciennes, 1835 coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. Observe o túbulo polar contendo 7-8 voltas.

Hospedeiro-tipo: *Pimelodella gracilis* Valenciennes, 1835 (Siluriformes: Heptapteridae).

Localidade-tipo: rio Jacaré-Guaçu (21°50'10.0"S 48°54'53.6"W), município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil.

Localidade no hospedeiro: único plasmódio aderido ao arco branquial.

Prevalência: 2,2% (1 de 46 peixes analisados estava parasitado).

Descrição: plasmódio continha mixoesporos maduros (n= 36) de *Myxobolus* n. sp. 5 com formato elipsoidal medindo $17,4 \pm 0,6$ (16,1-18,7) μm de comprimento, $11,1 \pm 0,5$ (9,3-11,8) μm de largura e 8,7 μm de espessura. As cápsulas polares com tamanho igual e formato piriforme têm $7,4 \pm 0,3$ (6,8-8,1) μm de comprimento e $4,2 \pm 0,2$ (3,7-4,8) μm de largura e ocupam a metade do corpo do mixoesporo. O túbulo polar tem de 7-8 voltas.

3.4. Resumo taxonômico

Filo Cnidaria Verrill, 1865

Subfilo Endocnidozoa Schuchert, 1996

Classe Myxozoa Grassé, 1970

Subclasse Myxosporea Bütschli, 1881
Ordem Bivalvulida Shulman, 1959
Família Myxobolidae Thélohan, 1892
Gênero *Henneguya* Thélohan, 1892
Espécie *Henneguya* n. sp. 5 (**Figura 4 A-B**).

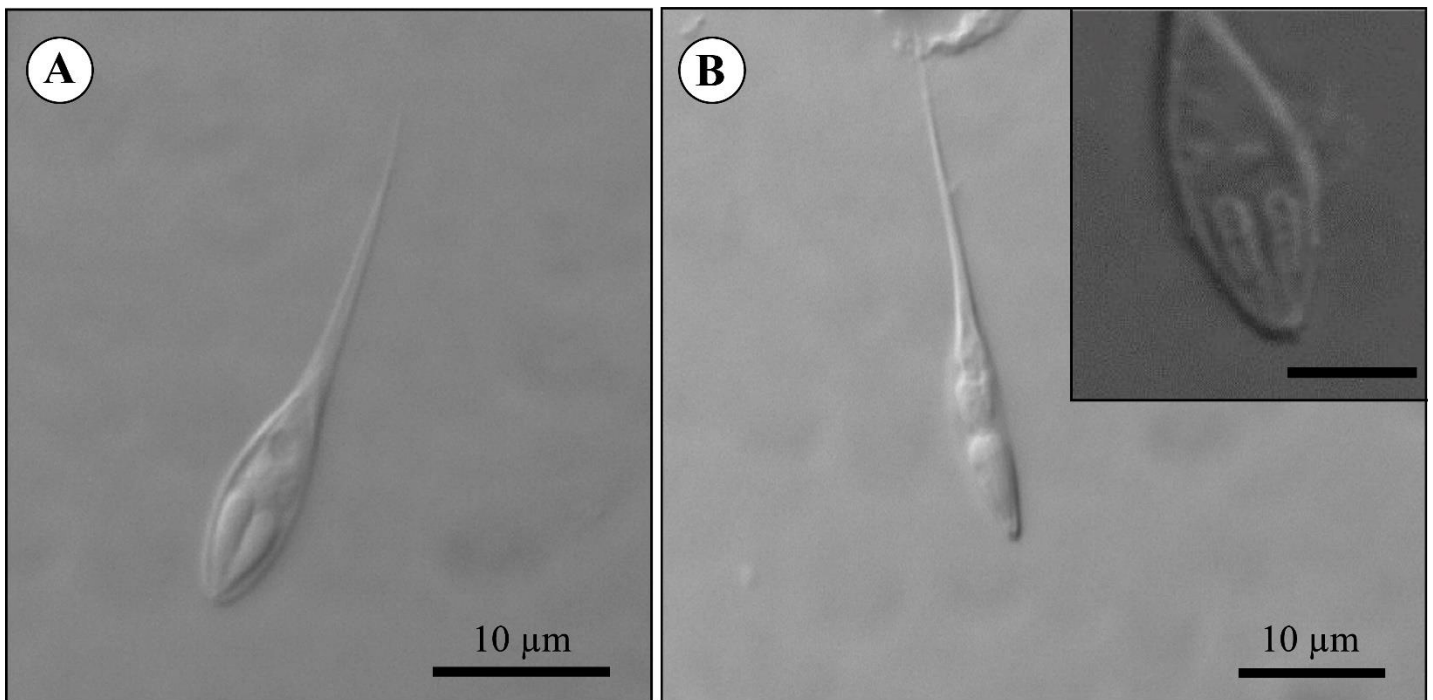


Figura 4. Fotomicrografia de mixoesporos maduro de *Henneguya* n. sp. 5 parasitando lamelas branquiais de *Pimelodella gracilis* Valenciennes, 1835 coletado no rio Jacaré-Guaçu, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Mixoesporo em vista frontal de *Henneguya* n. sp. 5. **B.** Mixoesporo em vista lateral de *Henneguya* n. sp. 5. Destaque: cápsulas polares com túbulos polares contendo 3-4 voltas. Barra de escala: 5 µm.

Hospedeiro-tipo: *Pimelodella gracilis* Valenciennes, 1835 (Siluriformes: Heptapteridae).

Localidade-tipo: rio Jacaré-Guaçu (21°50'10.0"S 48°54'53.6"W), município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil.

Órgão infectado: plasmódios aderidos à lamela branquial.

Prevalência: 2,2% (1 de 46 peixes analisados estava parasitado).

Descrição: plasmódios têm em média ~115,0 µm. Mixoesporos maduros (n= 61) de *Henneguya* n. sp. 5 estavam localizados na lamela branquial, têm formato do corpo fusiforme e medem 26,7±1,8 (21,8-30,4) µm de comprimento total do mixoesporo, 12,2±0,9 (9,2-14,9) µm de comprimento do corpo do mixoesporo, 4,9±0,3 (4,1-5,5) µm

da largura do corpo do mixoesporo, $14,6\pm 1,7$ ($11,2-17,6$) μm de comprimento dos apêndices caudais e $3,4\pm 0,4$ ($2,8-3,9$) μm de espessura. As cápsulas polares com tamanho igual e formato cônico medem $5,1\pm 0,4$ ($4,2-6,0$) μm de comprimento e $1,4\pm 0,2$ ($0,9-1,8$) μm de largura e ocupam a metade do corpo do mixoesporo. O túbulo polar possui de 3-4 voltas.

3.5. Análise molecular e filogenética

Sequências parciais do gene *ssrDNA* com 951 pb, 1518 pb e 919 pb foram obtidas para *Myxobolus* n. sp. 3, *Myxobolus* n. sp. 4 e *Myxobolus* n. sp. 5, respectivamente. Porém, para completarmos a análise filogenética deste estudo, tentamos realizar a PCR utilizando primers internos e não obtivemos êxito, no entanto, futuramente será necessário realizar novas análises moleculares, como a análise de distância genética para este estudo, para assim obtermos melhores resultados no agrupamento das espécies.

As análises filogenéticas mostram que algumas espécies de *Myxobolus*, *Henneguya* e *Thelohanellus* estão agrupadas em dois principais clados (Clado A-B) (**Figura 5**), formando diversos subclados, no qual as espécies de mixozoários estão agrupadas de acordo com a ordem das espécies hospedeiras. O clado A está composto por algumas espécies de *Myxobolus*, exceto por cinco espécies de *Henneguya* e três espécies de *Thelohanellus*. Neste clado, há predominância de espécies de mixozoários parasitos de peixes pertencentes as ordens Characiformes e Siluriformes, exceto por algumas espécies pertencentes as espécies de peixes das ordens Cyprinodontiformes, Cichliformes, Osteoglossiformes e Gymnotiformes.

No subclado A1 estão as novas espécies, no qual *Myxobolus* n. sp. 3 e *Myxobolus* n. sp. 4 estão bem suportados pela análise IB, embora ambas espécies exibem ramos longos, o que indica que será necessário o uso de primers internos para melhor colocação destas espécies. A princípio observamos que *Myxobolus* n. sp. 3 e *Myxobolus* n. sp. 4 têm afinidade genética com as espécies *M. prochilodus* Zatti, Arana, Maia e Adriano, 2016, *M. curimatae* Zatti, Naldoni, Silva, Maia e Adriano, 2015, *M. iarakiensis* Müller, Naldoni, Corrêa e Adriano, 2022 e *M. porofilus* Adriano, Arana, Ceccarelli e Cordeiro, 2002 parasitos de espécies de peixes da ordem Characiformes do Brasil e *Myxobolus* n. sp. 5 está alocada sozinha também no subclado A1 com valor bem suportado pela análise de IB. Na mesma linhagem, no subclado A2 estão os mixozoários parasitos de espécies de peixes pertencentes as ordens Cypriniformes e Siluriformes. O clado B constitui-se

principalmente por espécies de *Henneguya*, exceto por cinco espécies de *Myxobolus*. Neste clado, as espécies de mixozoários são exclusivamente de espécies de peixes da ordem Siluriformes, exceto pela espécie *H. santarenensis* Naldoni, Maia, Correa, da Silva e Adriano, 2018 que corresponde ser parasito de espécie de peixe da ordem Perciformes. A topologia gerada na análise ML é igual à topologia aqui apresentada pela análise de IB.

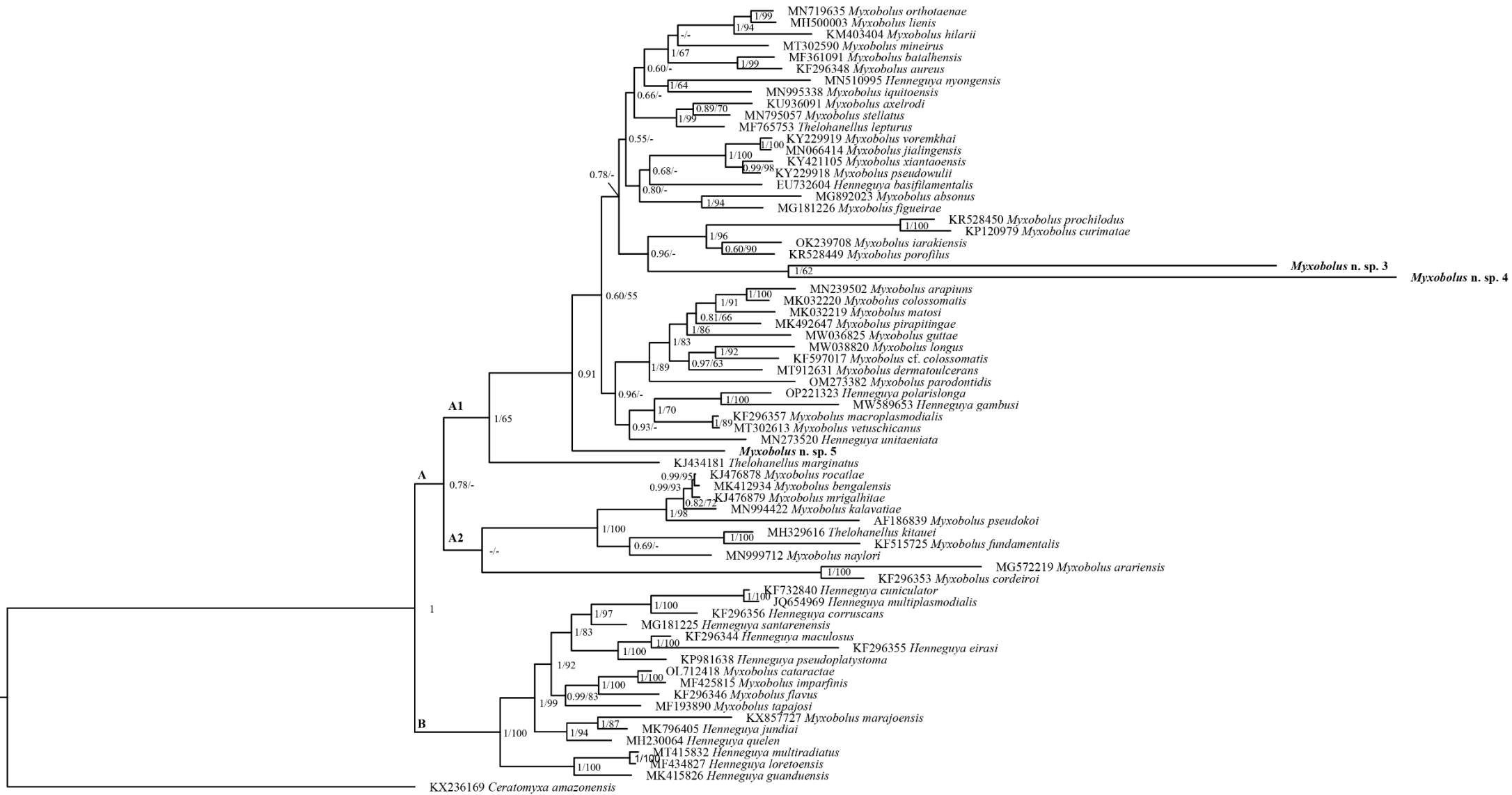


Figura 5. Árvore filogenética gerada pela análise de inferência Bayesiana (IB) baseada em sequências parciais ssrDNA de mixozoários dos gêneros *Myxobolus/Henneguya/The-lohanellus* com sequências parciais das novas espécies de *Myxobolus*. Os números de acesso ao GenBank são dados após o nome das espécies. Os números dos nós representam probabilidades posteriores da inferência Bayesiana (IB)/bootstrap de maximum likelihood (ML), respectivamente. Valores de suporte menores que 0.60/60 são representados por traços (-).

3.6. Comentários

As espécies de *Myxobolus* aqui relatadas foram comparadas morfometricamente com outras espécies de *Myxobolus* que parasitam espécies de peixes da família Heptapteridae e ordem Siluriformes (**Tabela 1**). *Myxobolus* n. sp. 3 coletado da musculatura do arco branquial tem maior similaridade com *M. arariensis* Abrunhosa, Sindeaux-Neto, Santos, Hamoy, e Matos, 2018, diferenciando-se pelo comprimento e largura das cápsulas polares (6,0-2,5 μm vs 4,0-1,9 μm) e formato dos mixoesporos (arredondados e piriformes vs elipsoidal). Alguns mixoesporos de *Myxobolus* n. sp. 3 e *M. arariensis* contêm presença de apêndice caudal. *Myxobolus* n. sp. 3 foi comparado morfometricamente com as espécies que parasitam o arco branquial dos hospedeiros e tem maior similaridade com *M. niger* Mathews, Maia e Adriano, 2016, mas diferenciam-se pela largura (8,3 μm vs 6,8 μm) e espessura (6,0 μm vs 4,1 μm) dos mixoesporos.

Os mixoesporos de *Myxobolus* n. sp. 4 coletados das nadadeiras caudal e peitoral e barbilhão também têm maior similaridade morfométrica com *M. arariensis*, mas diferenciam-se principalmente pela morfologia dos mixoesporos (arredondados vs elipsoidal). *Myxobolus* n. sp. 4 tem o mesmo número de voltas (5-6) do túbulo polar dos mixoesporos de *M. cordeiroi* Adriano, Arana, Alves, Silva, Ceccarelli, Henrique-Silva, Maia, 2009, mas todas as características morfométricas dos mixoesporos de *M. cordeiroi* são menores quando comparados a *Myxobolus* n. sp. 4. *Myxobolus* n. sp. 4 tem a mesma morfometria dos mixoesporos de *Myxobolus* n. sp. 3 relatado neste estudo, porém diferenciam-se principalmente pelo número de voltas do túbulo polar (5-6 vs 8-9), pelo formato do corpo do mixoesporo (arredondado vs fusiforme) e pelos órgãos infectados (nadadeiras e barbilhão vs arco branquial).

Myxobolus n. sp. 5 foi encontrado aderido ao arco branquial e os mixoesporos têm maior similaridade morfométrica com *M. iquitoensis* Mathews, Mertins, Milanin,

Espinoza, Gonzales-Florese, Audebert e Morandini, 2020, mas diferenciam-se pelo comprimento e largura das cápsulas polares (7,4-4,2 μm vs 8,7-3,3 μm), pela localidade geográfica (Brasil vs Peru) e pelos hospedeiros (*P. gracilis* vs *Otocinclus cocama* Reis, 2004).

As espécies aqui relatadas foram comparadas morfometricamente com *M. stokesi* por também parasitar espécie de peixe correspondente ao gênero *Pimelodella*. Porém, nenhuma das espécies de *Myxobolus* relatadas neste estudo têm similaridade morfométrica com as características de *M. stokesi*. *Myxobolus* n. sp. 3, *Myxobolus* n. sp. 4 e *Myxobolus* sp. 5 têm o comprimento e largura dos mixoesporos maiores e cápsulas polares maiores quando comparado aos mixoesporos de *M. stokesi*.

Henneguya n. sp. 5 também foi comparada morfometricamente com outras espécies de *Henneguya* descritas parasitando espécies de peixes da família Heptapteridae e ordem Siluriformes (**Tabela 2**). *Henneguya* n. sp. 5 tem maior similaridade com *H. corruscans* Eiras, Takemoto e Pavanelli, 2009 principalmente pelo tamanho dos mixoesporos e comprimento dos apêndices caudais, mas diferenciam-se pelo comprimento e largura das cápsulas polares (5,1-1,4 μm vs 6,8-2,0 μm) e pelo número de voltas do túbulo polar (3-4 vs 5-6).

Por fim, foi realizada análise morfométrica (**Tabela 1**) com as espécies de mixozoários (*M. prochilodus*, *M. curimatae*, *M. iarakensis* e *M. porofilus*) que têm maior afinidade filogenética com *Myxobolus* n. sp. 3 e *Myxobolus* n. sp. 4. Mas, *M. prochilodus* e *M. curimatae* exibem comprimento e largura do corpo dos mixoesporos maiores e *M. iarakensis* e *M. porofilus* mostram comprimento e largura do corpo dos mixoesporos menores quando comparados com os mixoesporos das novas espécies.

Não obtivemos êxito na amplificação do gene *ssrDNA* da espécie *Henneguya* n. sp. 5 e também para *Myxobolus* sp. 4 coletados da nadadeira peitoral e barbilhão, limitando as comparações genéticas com outras espécies de mixozoários.

Tabela 1. Características morfométricas dos mixoesporos de algumas espécies do gênero *Myxobolus* que parasitam espécies de peixes pertencentes as ordens Siluriformes e Characiformes da América do Sul. Comprimento do corpo do mixoesporo (CM), largura do corpo do mixoesporo (LM), espessura do corpo do mixoesporo (EM), comprimento da cápsula polar (CCP), largura da cápsula polar (LCP), ^a= cápsulas polares maiores, ^b=cápsulas polares menores, número de voltas do túbulo polar (TP), órgãos infectados (OI), informação ausente (-). Os valores estão representados em micrômetros (µm) e estão expressados por média ± desvio padrão. O intervalo dos valores mínimo e máximo estão entre parênteses.

Espécies	CM	LM	EM	CCP	LCP	TP	OI	Hospedeiros	Referências
<i>Myxobolus</i> n. sp. 3	11,7±0,7 (10,1-13,7)	8,3±0,5 (7,4-9,6)	6,0±0,4 (5,2-6,5)	6,0±0,5 (5,0-7,1)	2,5±0,3 (2,1-3,2)	8-9	Musculatura do arco branquial	<i>Pimelodella gracilis</i> Valenciennes, 1835	Presente estudo
	12,0±0,4 (11,5-12,9)	8,7±0,4 (8,0-9,8)	5,9±0,5 (4,9-6,8)	5,5±0,3 (4,7 - 6,1),	2,7±0,3 (2,2-3,6)		5-6	Nadadeira caudal	
<i>Myxobolus</i> n. sp. 4	11,9±0,4 (11,0-12,8)	8,6±0,3 (8,1-9,2)	-	5,3±0,4 (4,5-6,2)	2,7±0,2 (2,0-3,0)	5-6	Nadadeira peitoral	<i>P. gracilis</i>	Presente estudo
	11,5±0,4 (11,5-0,4)	7,8±0,5 (7,2-8,8)	-	4,4±0,4 (3,8-5,2)	2,2±0,2 (1,9-2,6)		-		
<i>Myxobolus</i> n. sp. 5	17,4±0,6 (16,1-18,7)	11,1±0,5 (9,3-11,8)	8,7	7,4±0,3 (6,8-8,1)	4,2±0,2 (3,7-4,8)	7-8	Arco branquial	<i>P. gracilis</i>	Presente estudo
<i>M. arariensis</i> Abrunhosa, Sindeaux-	11,4 (10,7-12,6)	7,2 (6,4-7,9)	-	4,0±0,7 (3,6-4,3)	1,9±0,4 (1,7-2,2)	-	Músculos	<i>Rhamdia quelen</i> (Quoy e Gaimard, 1824)	Abrunhosa et al. (2018a)

Neto, Santos, Hamoy e Matos, 2018

<i>M. niger</i> Mathews, Maia e Adriano, 2016	11,3±0,4	6,8±0,2	4,1±0,2	5,0±0,3	2,0±0,1	6-7	Arco branquial	<i>Corydoras melini</i> Lönnberg e Rendahl, 1930	Mathews et al. (2016a)
<i>M. iquitoensis</i> Mathews, Mertins, Milanin, Espinoza, Flores-Gonzales, Audebert e Morandini, 2020	17,6±1,2 (16,2-19,8)	10,5±0,7 (9,8-12,0)	-	8,7±0,4 (6,9-9,3)	3,3±0,2 (3,0-3,6)	6-7	Filamento branquial	<i>Otocinclus cocama</i> Reis, 2004	Mathews et al. (2020a)
<i>M. stokesi</i> Pinto, 1928	8,5	5,3	-	3,1	1,7	-	Narina	<i>Pimelodella</i> sp. Eigenmann, 1888	Pinto (1928)
<i>M. cataractae</i> Vieira, Narciso e da Silva, 2022	7,8±0,4	5,9±0,4	3,9±0,3	3,5±0,2	1,7±0,2	6-7	Filamento branquial	<i>Imparfinis mirini</i> Haseman, 1911	Vieira et al. (2022)
<i>M. adrianoi</i> Mathews, Madrid, Mertins, Rigoni e Morandini, 2020	22,4±0,3	16,3±0,1	-	14,3± 0,2	6,5± 0,1	5	Intestino	<i>Corydoras schwartzi</i> Rössel, 1963	Mathews et al. (2020b)
<i>M. tapajosi</i> Zatti, Atkinson, Maia, Corrêa,	15,0 (13,5-17,0)	10,7 (9,6-11,4)	-	5,8 (4,6-7,1)	3,0 (2,3-3,8)	6-7	Filamento branquial	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> (Castelnau, 1855)	Zatti et al. (2018)

Bartholomew e Adriano, 2018									
<i>M. imparfinis</i> Vieira, Tagliavini, Abdallah e Azevedo, 2018	7,9±0,3 (7,1-8,4)	5,5±0,5 (4,5-6,2)	3,7±0,3 (3,1-4,2)	3,9±0,3 (3,4-4,5) ^a 3,4±0,2 (3,1-3,8) ^b	1,7±0,1 (1,4-2,0) ^a 1,5±0,2 (1,2-1,8) ^b	6-7	Brânquias	<i>I. mirini</i>	Vieira et al. (2018)
<i>M. imparfinis</i>	8,1 (6,6-8,8)	5,7 (5,0-6,4)	3,6 (3,5-3,8)	4,3 (3,6-4,8) ^a 3,8 (3,1-4,3) ^b	1,7 (1,4-1,9) ^a 1,5 (1,2-1,7) ^b	7-8	Brânquias	<i>Cetopsorhamdia iheringi</i> Schubart e Gomes, 1959	Franceschini et al. (2019)
<i>M. marajoensis</i> Abrunhosa, Sindeaux-Neto, Santos, Hamoy e Matos, 2018	10,9 (10,0-11,6)	5,1 (4,2-5,4)	-	5,3±0,6	1,6±0,4	-	Intestino	<i>R. quelen</i>	Abrunhosa et al. (2017)
<i>M. figueirae</i> Naldoni, Maia, Correa, da Silva e Adriano, 2018	9,5±0,3 (9,1-10,0)	6,4±0,3 (5,8-6,9)	4,5±0,1 (4,4-4,5)	4,1±0,3 (3,5-4,6) ^a 3,2±0,3 (2,4-3,6) ^b	2,1±0,3 (1,7-2,6) ^a 1,4±0,2 (1,2-2,1) ^b	7-8	Pele	<i>Phractocephalus hemioliopterus</i> (Bloch e Schneider, 1801)	Naldoni et al. (2018)

<i>M. flavus</i> Carriero, Adriano, Silva, Ceccarelli e Maia, 2013	9,2±0,2	6,5±0,3	4,2±0,2	4,5±0,2	1,6±0,1	4-5	Arco branquial	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> (Spix e Agassiz, 1829)	Carriero et al. (2013)
<i>M. sciades</i> Azevedo, Casal, Mendonça, Carvalho, Matos e Matos, 2010	9,2±0,4	4,4±0,2	2,6±0,3	4,4±0,4	1,4±0,4	9-10	Lamela branquial	<i>Sciades herzbergii</i> (Bloch, 1794)	Azevedo et al. (2010)
<i>M. cordeiroi</i> Adriano, Arana, Alves, Silva, Ceccarelli, Henrique-Silva e Maia, 2009	10,8-11,3	7,1-7,5	5,2-5,6	5,2-5,4	1,4-1,5	5-6	Brânquias, pele, bexiga urinária, serosa e olhos	<i>Zungaro jahu</i> (Ihering, 1898)	Adriano et al. (2009)
<i>M. heckelii</i> Azevedo, Casal, Matos, Ferreira e Matos, 2009	12,7 (12,2-13,1)	6,6 (6,3-6,9)	4,0 (3,7-4,4)	2,9 (2,7-3,3)	1,7 (1,4-2,0)	4-5	Filamento branquial	<i>Centromochlus heckelii</i> (De Filippi, 1853)	Azevedo et al. (2009)
<i>M. absonus</i> Cellere, Cordeiro e Adriano, 2002	15,7±1,5	10,2±0,7	-	6,4±0,7 ^a 4,2±0,6 ^b	3,6±0,5 ^a 2,5±0,5 ^b	3-5	Cavidade opercular	<i>Pimelodus maculatus</i> Lacepède, 1803	Cellere et al. (2002)
<i>M. braziliensis</i> Casal, Matos e Azevedo, 1996	10,2 (9,5-10,9)	5,3 (4,7-5,9)	3,7 (3,2-4,0)	5,3 (5,0-5,5)	1,4 (1,4-1,4)	9-10	Lamela branquial	<i>Bunocephalus coracoideus</i> (Cope, 1874)	Casal et al. (1996)

<i>M. kudo</i> Guimarães e Bergamini, 1938	8,5	6,5	-	3,5	1,3	-	Tegumento	<i>Nemathognata</i> sp.	Guimarães e Bergamini (1938)
<i>M. prochilodus</i> Zatti, Arana, Maia e Adriano, 2016	15,9±1,2 (14,1-17,4)	13,3±1,0 (11,3-14,5)	8,0±0,1 (7,9-8,2)	7,1±0,9 (5,7-8,3)	3,6±0,5 (3,0-4,5)	10-11	Filamento branquial	<i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1837)	Zatti et al. (2016)
<i>M. curimatae</i> Zatti, Naldoni, Silva, Maia e Adriano, 2015	13,2±0,9 (12,0-14,7)	9,7±1,0 (7,0-10,8)	-	5,2±0,5 (4,1-5,8)	2,5±0,5 (1,7-3,9)	9-10	Filamento branquial	<i>Prochilodus costatus</i> Valenciennes, 1850	Zatti et al. (2015)
<i>M. iarakiensis</i> Müller, Naldoni, Corrêa e Adriano, 2022	8,0±0,4 (6,7-8,6)	5,6±0,4 (4,5-6,3)	3,8±0,5 (2,7-4,7)	2,9±0,3 (2,1-3,7)	1,5±0,2 (1,1-2,0)	4-5	Arco branquial	<i>Semaprochilodus insignis</i> (Jardine, 1841)	Müller et al. (2022)
<i>M. porofilus</i> Adriano, Arana, Ceccarelli e Cordeiro, 2002	5,7±0,3	4,8±0,2	-	1,6±0,1	1,1±0,1	3	Órgãos internos	<i>P. lineatus</i>	Adriano et al. (2002)

Tabela 2. Características morfométricas dos mixoesporos de *Henneguya* spp. que parasitam espécies de peixes da família Heptapteridae e ordem Siluriformes da América do Sul. Comprimento total do mixoesporo (CTM), comprimento do corpo do mixoesporo (CM), largura do corpo do mixoesporo (LM), espessura do corpo do mixoesporo (EM), comprimento do apêndice caudal (CAC), comprimento da cápsula polar (CCP), largura da cápsula polar (LCP), ^a= cápsulas polares maiores, ^b=cápsulas polares menores, número de voltas do túbulo polar (TP), órgãos infectados (OI), informação ausente (-). Os valores estão representados em micrômetros (µm) e estão expressados por média ± desvio padrão. O intervalo dos valores mínimo e máximo estão entre parênteses.

Espécies	CTM	CM	LM	EM	CAC	CCP	LCP	TP	OI	Hospedeiros	Referências
<i>Pimelodella</i>											
<i>Henneguya</i> n. sp. 5	26,7±1,8	12,2±0,9	4,9±0,3	3,4±0,4	14,6±1,7	5,1±0,4	1,4±0,2	3-4	Lamela	<i>gracilis</i>	Presente
	(21,8-30,4)	(9,2-14,9)	(4,1-5,5)	(2,8-3,9)	(11,2-17,6)	(4,2-6,0)	(0,9-1,8)		branquial	Valenciennes,	estudo
<i>Pseudoplatysto</i>											
<i>H. corruscans</i> Eiras, Takemoto e Pavanelli, 2009	27,6	14,3	5,0	4,0	13,7	6,8	2,0	5-6	Filamento	<i>ma corruscans</i>	Eiras et al.
	(25,0-29,0)	(13,0-15,0)			(12,0-15,0)	(6,0-7,0)			branquial	(Spix e (2009)	Agassiz, 1829)

H. multiradiatus

Mathews, Mertins,

Espinoza, Milanin,

Alama-Bermejo,

Audebert, e

Morandini, 2020

H. jundiai Negrelli,

Vieira, Tagliavini,

Abdallah e

Azevedo, 2019

H. quelen

Abrunhosa,

Sindeaux-Neto,

Hamoy e Matos,

2018

44,5±0,6

(43,9-45,1)

18,7±0,9

(16,8-19,6)

7,1±0,2

(6,6-7,4)

5,5±0,3

(4,9-5,6)

25,8±0,6

(24,7-26,5)

9,1±0,1

(8,8-9,4)

1,7±0,1

(1,6-1,8)

10-11

Cavidade

visceral

Brochis

multiradiatus

(Orcés, 1960)

Mathews et

al. (2020c)

Rhamdia

quelen (Quoy e

Gaimard,

1824)

Negrelli et

al. (2019)

40,0±2,8

(37,0-42,8)

15,6±0,8

(14,3-16,4)

4,1±0,3

(3,9-4,4)

-

-

24,3±2,2

(21,0-26,5)

5,5±0,5

(5,2-6,0)

1,6±0,2

(1,4-1,8)

6-7

Arco

branquial

-

Rim

R. quelen

Abrunhosa

et al.

(2018b)

<i>H. loretoensis</i> Mathews, Naldoni e Adriano, 2017	36,2±0,1	14,3±0,1	5,1±0,1	-	21,8±0,1	5,1±0,1	2,4±0,2	5	Filamento branquial	<i>Corydoras</i> <i>leucomelas</i> Eigenmann e Allen, 1942	Mathews et al. (2017)
	(36,1-36,3)	(14,2-14,4)	(4,9-5,3)		(21,8-22,0)	(4,9-5,3)	(2,1-2,7)				
<i>H. melini</i> Mathews, Maia e Adriano, 2016	40,8±0,3	15,5±0,2	4,7±0,1	-	25,3±0,1	4,8±0,5	1,7±0,3	5-6	Filamento branquial	<i>Corydoras</i> <i>melini</i> Lönnerberg e Rendahl, 1930	Mathews et al. (2016b)
	(40,3-41,1)	(15,3-15,7)	(4,6-4,8)		(25,2-25,4)	(4,3-5,3)	(1,4-2,0)				
<i>H. maculosus</i> Carriero, Adriano, Silva, Ceccarelli e Maia, 2013	-	13,7±0,6	4,1±0,2	3,0±0,2	17,5±1,0	5,6±0,5	1,6±0,2	6-7	Filamento branquial	<i>P. corruscans</i> e <i>P. reticulatum</i> Eigenmann e Eigenmann, 1889	Carriero et al. (2013)

H. cuniculator

Naldoni, Maia, 29,4±2,4 12,1±1,0 4,8±0,4 4,2±0,7 16,7±2,0 6,2±0,3 1,8±0,1 10-11 Filamento
Silva e Adriano, (23,3-32,4) (10,0-14,7) (4,0-5,9) (3,9-4,9) (12,3-19,4) (5,2-6,2) (1,4-1,9) branquial *P. corruscans* Naldoni et
2014 al. (2014)

H.

multiplasmodialis

Adriano, Carriero, 30,8±1,3 14,7±0,5 5,2±0,3 4,4±0,1 15,4±1,3 6,1±0,1 1,4±0,1 6-7 Arco e
Maia, Silva, filamento *P. corruscans* e Adriano et
Naldoni, Ceccarelli *P. reticulatum* al. (2012)
e Arana, 2012 branquial

H. eirasi Naldoni,

Arana, Maia, Silva, *P. corruscans* e
Carriero, 37,1±1,8 12,9±0,8 3,4±0,3 3,1±0,1 24,6±2,2 5,4±0,5 0,7±0,1 12-13 Filamento *P. fasciatum* Naldoni et
Ceccarelli, Tavares branquial (Linnaeus, al. (2011)
e Adriano, 2011 1766)

H.

pseudoplatystoma

Naldoni, Arana,
Maia, Ceccarelli,
Tavares, Borges,
Pozo, e Adriano,
2009

33,2±1,9

10,4±0,6

3,4±0,4

4,5±0,1

22,7±1,7

3,3±0,4

1,0±0,1

6-7

Filamento
branquial

P. corruscans e
P. fasciatum

Naldoni et
al. (2009)

H. guanduensis

Abdallah, Azevedo,
Luque e Bomfim,
2007

33,6

14,6

6,5

-

19,0

(3,3-5,6)^a

(1,6-2,3)^a

3-6

Brânquias

Hoplosternum
littorale
(Hancock,
1828)

Abdallah et
al. (2007)

(3,3-5,3)^b

(1,5-2,8)^b

H. rhamdia Matos,
Tajdari, e Azevedo,
2005

50,0±1,8

13,1±1,1

5,2±0,5

2,5±0,5

36,9±1,6

4,7±0,4

1,1±0,2

10-11

Filamento
branquial

R. quelen

Matos et al.
(2005)

<i>H. occulta</i>	36,0	16,0	8,0	-	20,0	8,0	-	-	Brânquias	<i>Loricaria</i> sp.	Nemeczek (1926)
Nemeczek, 1926											

4. Discussão

As espécies de mixozoários aqui relatadas: *Myxobolus* n. sp. 3, *Myxobolus* n. sp. 4, *Myxobolus* n. sp. 5 e *Henneguya* n. sp. 5 divergem pela morfologia, pelos hospedeiros, pelos órgãos infectados e pelas regiões geográficas em relação às outras espécies de *Myxobolus* e *Henneguya* descritas anteriormente em espécies de peixes da família Heptapteridae e ordem Siluriformes coletados na América do Sul. Este é o primeiro registro de mixozoários no hospedeiro *P. gracilis* e o primeiro registro de *Myxobolus* parasitando nadadeiras de espécies de peixes da família Heptapteridae e ordem Siluriformes da América do Sul.

Quanto às informações filogenéticas, este estudo associa-se com outros estudos, mostrando que o destaque para o sinal evolutivo é o agrupamento das espécies de mixozoários de acordo com a família e/ou ordem dos hospedeiros (Fiala, 2006; Ferguson et al., 2008). Porém, doze espécies de *Myxobolus*, incluindo as espécies descritas aqui, uma espécie de *Henneguya* e uma espécie de *Thelohanellus* parasitos de espécies de peixes da ordem Siluriformes não exibem origem monofilética (**Figura 5**) corroborando com estudos anteriores no qual mostra que algumas espécies de mixozoários da família Myxobolidae parasitos de peixes da ordem Siluriformes não são monofiléticos. Portanto, esse agrupamento parafilético pode estar relacionado aos caminhos evolutivos distintos dos parasitos, tendo a hipótese do tempo que os hospedeiros adquirem os parasitos (Holzer et al., 2018; Naldoni et al., 2018).

Como pode-se observar na árvore filogenética a espécie *Myxobolus* n. sp. 5 aparece sozinha. Adriano et al. (2009) já haviam relatado a mesma condição com a espécie *M. cordeiroi* Adriano, Arana, Alves, Silva, Ceccarelli, Henrique-Silva e Maia, 2009 que apareceu alocada sozinha e com isso indicaram que essa situação pode ter ocorrido por haver um grupo específico de espécies de *Myxobolus* que são filogeneticamente relacionados e parasitam espécies de peixes provenientes da América do Sul ou espécies de peixes heptapterídeos. Ainda mais, aqui sugerimos que essa ausência de agrupamento é devida as espécies que são filogeneticamente próximas e que ainda não foram identificadas molecularmente. Pois, como podemos analisar na árvore filogenética gerada neste estudo, *M. cordeiroi* aparece como taxa irmã de *M. arariensis*, espécie descrita posteriormente. Portanto, essas hipóteses poderão ser sustentadas futuramente com estudos moleculares e filogenéticos das novas espécies de mixozoários.

Myxobolus n. sp. 3 e *Myxobolus* n. sp. 4 contêm alguns mixoesporos dispersos com a presença de apêndices caudais, característica típica das espécies pertencente ao gênero *Henneguya*. A presença de apêndice caudal em mixoesporos de *Myxobolus* corrobora com as informações já relatadas por Kent et al. (2001), pois na análise filogenética algumas espécies correspondentes aos gêneros *Myxobolus* e *Henneguya* ficam agrupadas no mesmo clado, sendo assim, os autores inferiram que os apêndices caudais não são uma característica válida para a separação das espécies de *Myxobolus* e *Henneguya*. Além disso, diversos estudos taxonômicos mostram que alguns mixoesporos de *Myxobolus* têm a presença de apêndices caudais, assim como o presente estudo (El-Mansy, 2005; Bahri, 2008; Liu et al., 2010, 2013, 2014; Vieira et al., 2022).

Algumas hipóteses sobre a presença dessa característica atípica nos mixoesporos de espécies do gênero *Myxobolus* foram relatadas por Liu et al. (2019), pois algumas espécies de mixozoários de ambiente marinhos não necessitam de estruturas que auxiliam no alcance do hospedeiro para realizar a transmissão devido ao ambiente marinho ter maior densidade. Desse modo, os mixoesporos de algumas espécies de *Henneguya* podem ter se diferenciado e conseqüentemente ter sido inserido no gênero *Myxobolus* pela ausência de apêndice caudal. Outra hipótese é que a formação dos apêndices caudais nos mixoesporos de espécies de *Myxobolus* podem estar relacionadas com o tipo de órgão infectado.

De fato, não conseguimos a amplificação *ssrDNA* para a espécie *Henneguya* n. sp. 5 por PCR convencional, assim como, as espécies *Myxobolus* sp. 3 e *Myxobolus* sp. 4 exibem ramos longos na filogenia gerada, portanto, a próxima etapa para tentarmos alcançar bons resultados dessa amplificação será utilizando outros conjuntos de primers ou realizar a clonagem da PCR em plasmídeo. Pois, estudos complementares, como as análises moleculares e filogenéticas são essenciais, porque mesmo com as diferenças morfológicas e morfométricas dos mixoesporos das espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* sabemos que os mixozoários são semelhantes morfologicamente e que podem haver espécies crípticas (Lom e Dyková, 2006; Kato et al., 2017).

As espécies de mixozoários descritas aqui foram consideradas novas espécies pelo conjunto de informações, como a especificidade do hospedeiro, órgãos infectados, distribuição geográfica e pelas características morfológicas e moleculares do gene *ssrDNA*. Sendo assim, o registro dessas espécies é essencial para expandir os conhecimentos da biodiversidade dos mixozoários parasitos de peixes em rios do estado

de São Paulo, Brasil, pois os microparasitos dessa região ainda são pouco estudados em relação à alta biodiversidade da ictiofauna presente.

5. Referências

- Abdallah, V. D., Azevedo, R., Luque, J. L., Bomfim, T. C. B. (2007). Two new species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa, Myxobolidae), parasitic on the gills of *Hoplosternum littorale* (Callichthyidae) and *Cyphocharax gilbert* (Curimatidae) from the Guandu River, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitologia Latinoamericana*, 62(1-2), 35-41.
- Abrunhosa, J., Sindeaux-Neto, J. L., Santos, Â., Hamoy, I., Matos, E. (2017). *Myxobolus marajoensis* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae), parasite of the freshwater catfish *Rhamdia quelen* from the Brazilian Amazon region. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26(4), 465-471.
- Abrunhosa, J., Sindeaux-Neto, J. L., Santos, S., Hamoy, I., Matos, E. (2018a). A new species of myxozoa in the skeletal striated musculature of *Rhamdia quelen* (Quoy Gaimard) (Siluriforme: Pimelodidae) Amazonian fish, Marajó island, Brazil. *Zootaxa*, 4482(1), 164-176.
- Abrunhosa, J., Sindeaux-Neto, J. L., Hamoy, I., Matos, E. R. (2018b). A new species of Myxosporea, *Henneguya quelen*, from silver catfish *Rhamdia quelen* (Siluriforme: Pimelodidae) in the Amazonian region. *Parasitology Research*, 117(12), 3809-3820.
- Adriano, E. A., Arana, S., Ceccarelli, P. S., Cordeiro, N. S. (2002). Light and scanning electron microscopy of *Myxobolus porofilus* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting the visceral cavity of *Prochilodus lineatus* (Pisces: Characiformes: Prochilodontidae) cultivated in Brazil. *Folia Parasitologica*, 49(4), 259-262.
- Adriano, E. A., Arana, S., Alves, A. L., Silva, M. R., Ceccarelli, P. S., Henrique-Silva, F., Maia, A. A. (2009). *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: morphology, phylogeny and histopathology. *Veterinary Parasitology*, 162(3-4), 221-229.
- Adriano, E. A., Carriero, M. M., Maia, A. A., Silva, M. R., Naldoni, J., Ceccarelli, P. S., Arana, S. (2012). Phylogenetic and host-parasite relationship analysis of *Henneguya multiplasmodialis* n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland. *Veterinary Parasitology*, 185(2-4), 110-120.
- Andree, K. B., Gresoviac, S. J., Hedrick, R. P. (1997). Small subunit ribosomal RNA sequences unite alternate actinosporean and myxosporean stages of *Myxobolus*

- cerebralis* the causative agent of whirling disease in salmonid fish. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 44(3), 208-215.
- Andree, K. B., Székely, C., Molnár, K., Gresoviac, S. J., Hedrick, R. P. (1999). Relationships among Members of the Genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bilvalvidae) Based on Small Subunit Ribosomal DNA Sequences. *The Journal of Parasitology*, 85(1), 68.
- Atkinson, S.D., Bartholomew, J.L., Lotan, T. (2018). Myxozoans: ancient metazoan parasites find a home in phylum Cnidaria. *Zoology*, 129, 66-68.
- Azevedo, C., Casal, G., Matos, P., Ferreira, I., Matos, E. (2009). Light and Electron Microscopy of the Spore of *Myxobolus heckelii* n. sp. (Myxozoa), Parasite from the Brazilian Fish *Centromochlus heckelii* (Teleostei, Auchenipteridae). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56, 589-593.
- Azevedo, C., Casal, G., Mendonça, I., Carvalho, E., Matos, P., Matos, E. (2010). Light and electron microscopy of *Myxobolus sciades* n. sp. (Myxozoa), a parasite of the gills of the Brazilian fish *Sciades herzbergii* (Block, 1794) (Teleostei: Ariidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2), 203-207.
- Bahri, S. (2008). Abnormal forms of *Myxobolus bizerti* and *Myxobolus mülleri* (Myxosporae: Bivalvulida) spores with caudal appendages. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 28(6), 252-255.
- Barassa, B., Adriano, E. A., Arana, S., Cordeiro, N. S. (2003). *Henneguya curvata* sp. n. (Myxosporae: Myxobolidae) parasitizing the gills of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae: Serrasalminidae), a South American freshwater fish. *Folia Parasitologica*, 50, 151-153.
- Barta, J. R., Martin, D. S., Liberator, P. A., Dashkevich, M., Anderson, J. W., Feighner, S. D., Elbrecht, A., Perkins-Barrow, A., Jenkins, M. C., Danforth, H. D. (1997). Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *Journal for Parasitology*, 83, 262-271.
- Bartholomew, J. L., Atkinson, S. D., Hallett, S. L., Lowenstine, L. J., Garner, M. M., Gardiner, C. H., Brown, J. D. (2008). Myxozoan parasitism in waterfowl. *International Journal for Parasitology*, 38(10), 1199-1207.
- Bockmann, F.A., Guazzelli, G.M. (2003). Heptapteridae (Heptapterids). In: Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris, C. J. Jr. Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil. p. 406-431.

- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., Shostak, A. W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology*, 83(4), 575-583.
- Canning, E. U., Okamura, B. (2004). Biodiversity and evolution of the Myxozoa. *Advances in Parasitology*, 56(56), 43-131.
- Carriero, M. M., Adriano, E. A., Silva, M. R., Ceccarelli, P. S., Maia, A. A. (2013). Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. *PloS One*, 8(9), e73713.
- Casal, G., Matos, E., Azevedo, C. (1996). Ultrastructural data on the life cycle stages of *Myxobolus brasiliensis* n. sp., parasite of an Amazonian fish. *European Journal of Protistology*, 32, 12-127.
- Cellere, E. F., Cordeiro, N. S., Adriano, E. A. (2002). *Myxobolus absonus* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea) parasitizing *Pimelodus maculatus* (siluriformes: Pimelodidae), a South American freshwater fish. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(1), 79-80.
- Darriba, D., Taboada, G., Doallo, R. et al. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.
- Eiras, J. C. (2002). Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Systematic Parasitology*, 52(1), 43-54.
- Eiras, J. C., Molnár, K., Lu, Y. S. (2005). Synopsis of the species of *Myxobolus* Butschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Systematic parasitology*, 61(1), 1-46.
- Eiras, J. C., Takemoto, R. M., Pavanelli, G. C. (2009). *Henneguya corruscans* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea, Myxobolidae), a parasite of *Pseudoplatystoma corruscans* (Osteichthyes, Pimelodidae) from the Paraná River, Brazil: a morphological and morphometric study. *Veterinary Parasitology*, 159(2), 154-158.
- Eiras, J. C., Adriano, E. (2012). A checklist of new species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2002 and 2012. *Systematic Parasitology*, 83, 95-104.
- Eiras, J. C., Zhang, J., Molnár, K. (2014). Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. *Systematic Parasitology*, 88(1), 11-36.

- Eiras, J. C., Cruz, C. F., Saraiva, A., Adriano, E. A. (2021). Synopsis of the species of *Myxobolus* (Cnidaria, Myxozoa, Myxosporea) described between 2014 and 2020. *Folia Parasitologica*, 68, 2021.012.
- El-Mansy, A. (2005). Revision of *Myxobolus heterosporus* Baker, 1963 (syn. *Myxosoma heterospora*) (Myxozoa: Myxosporea) in African records. *Diseases of Aquatic Organisms*, 63(2-3), 205-214.
- Feist, S. W., Longshaw, M. (2006). Phylum Myxozoa. In: WOO, P. T. K. (org.). *Fish diseases and disorders. Protozoan and metazoan infections*. Wallingford: CABI Publishing, p. 230-296.
- Ferguson, J. A., Atkinson, S. D., Whipps, C. M., Kent, M. L. (2008). Molecular and morphological analysis of *Myxobolus* spp. of salmonid fishes with the description of a new *Myxobolus* species. *Journal of Parasitology*, 94, 1322-13133.
- Fiala, I. (2006). The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *International Journal for Parasitology*, 36, 1521-1534.
- Figueredo, R. T. A., de Oliveira, J. E. F., Vilhena, M. P. S. P., Berredo, J., Dos Santos, W. J. P., Matos, E., Velasco, M. (2020). Henneguyosis in gills of *Metynnis hypsauchen*: an Amazon freshwater fish. *Journal of Parasitic Diseases*, 44, 213-220.
- Franceschini, L., Vieira, D., Zago, A. C., Azevedo, R. K., Abdallah, V. D., da Silva, R. J. (2019). New data on *Myxobolus imparfinis* (Cnidaria, Myxosporea): host, distribution, and ultrastructural morphology. *Parasitology Research*, 118(6), 1967-1973.
- Gómez, D., Bartholomew, J., Sunyer, J.O. (2014) Biology and mucosal immunity to myxozoans. *Developmental and Comparative Immunology*, 43(2), 243-256.
- Griffin, M. J., Khoo, L. H., Torrans, L., Bosworth, B. G., Quiniou, S. M., Gaunt, P. S., Pote, L. M. (2009). New Data on *Henneguya pellis* (Myxozoa: Myxobolidae), a Parasite of Blue Catfish *Ictalurus furcatus*. *The Journal of Parasitology*, 95(6), 1455-1467.
- Guimarães, J. R. A., Bergamin, F. (1938). Sobre um novo myxosporideo parasito de peixe de água doce. *Myxobolus kudo* sp. n. *Revista de Indústria Animal*, 1, 65-67.
- Hallett, S. L., Diamant, A. (2001). Ultrastructure and small-subunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya lesteri* n. sp. (Myxosporea), a parasite of sand whiting

- Sillago analis* (Sillaginidae) from the coast of Queensland. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46, 197-212.
- Hillis, D. M., Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66, 411-453.
- Holzer, A. S., Bartošová-Sojková, P., Born-Torrijos, A., Lovy, A., Hartigan, A., Fiala, I. (2018). The jointevolution of the Myxozoa and their alternate hosts: A cnidarian recipe for success and vast biodiversity. *Molecular Ecology*, 27, 1651-1666.
- Kato, E., Kasai, A., Tomochi, H., Li, Y. C., Sato, H. (2017). Four *Myxobolus* spp. (Myxosporae: Bivalvulida) from the gill lamellae of common carp (*Cyprinus carpio*) and Japanese silver crucian carp (*Carassius langsdorffii*) in the western part of Japan, with the description of three new species (*M. tanakai* n. sp., *M. paratoyamai* n. sp., and *M. ginbuna* n. sp.). *Parasitology Research*, 116(9), 2427-2441.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Kent, M. L., Andree, K. B., Bartholomew, J. L., Mansour, E., Desser, S. S., Devlin, R. H., Hallett, S. L. (2001). Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(4), 395-413.
- Liu, Y., Whipps, C. M., Gu, Z. M., Zeng, L. B. (2010). *Myxobolus turpisrotundus* (Myxosporae: Bivalvulida) spores with caudal appendages: investigating the validity of the genus *Henneguya* with morphological and molecular evidence. *Parasitology Research*, 107(3), 699-706.
- Liu, Y., Whipps, C. M., Gu, Z. M., Huang, M. J., He, C., Yang, H. L., Molnár, K. (2013). *Myxobolus musseliusae* (Myxozoa: Myxobolidae) from the gills of common carp *Cyprinus carpio* and revision of *Myxobolus dispar* recorded in China. *Parasitology Research*, 112(1), 289-296.
- Liu, Y., Whipps, C. M., Nie, P., Gu, Z. (2014). *Myxobolus oralis* sp. n. (Myxosporae: Bivalvulida) infecting the palate in the mouth of gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Cypriniformes: Cyprinidae). *Folia Parasitologica*, 61(6), 505.
- Liu, Y., Lövy, A., Gu, Z., Fiala, I. (2019). Phylogeny of Myxobolidae (Myxozoa) and the evolution of myxospore appendages in the *Myxobolus* clade. *International*

- Journal for Parasitology*, 49(7), 523-530.
- Lom, J., Arthur, J. R. (1989). A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporidia. *Journal of Fish Diseases*, 12(2), 151-156.
- Lom, J., Dyková, I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica*, 53(1), 1-36.
- Mathews, P. D., Maia, A., Adriano, E. A. (2016a). Morphological and ultrastructural aspects of *Myxobolus niger* n. sp. (Myxozoa) gill parasite of *Corydoras melini* (Siluriformes: Callichthyidae) from Brazilian Amazon. *Acta Tropica*, 158, 214-219.
- Mathews, P. D., Maia, A. A., Adriano, E. A. (2016b). *Henneguya melini* n. sp. (Myxosporidia: Myxobolidae), a parasite of *Corydoras melini* (Teleostei: Siluriformes) in the Amazon region: morphological and ultrastructural aspects. *Parasitology Research*, 115(9), 3599-3604.
- Mathews, P. D., Naldoni, J., Adriano, E. A. (2017). Morphology and small subunit rDNA-based phylogeny of a new *Henneguya* species, infecting the ornamental fish *Corydoras leucomelas* from the Peruvian Amazon. *Acta Tropica*, 176, 51-57.
- Mathews, P. D., Mertins, O., Milanin, T., Espinoza, L. L., Flores-Gonzales, A. P., Audebert, F., Morandini, A. C. (2020a). Molecular Phylogeny and taxonomy of a new *Myxobolus* species from the endangered ornamental fish, *Otocinclus cocama* endemic to Peru: A host-parasite coextinction approach. *Acta Tropica*, 210, 105545.
- Mathews, P., Madrid, R., Mertins, O., Rigoni, V., Morandini, A. (2020b). A new *Myxobolus* (Cnidaria: Myxosporidia) infecting the ornamental catfish *Corydoras schwartzi* from the Purus River in Brazil. *European Journal of Taxonomy*, 620, 1-14
- Mathews, P. D., Mertins, O., Espinoza, L. L., Milanin, T., Alama-Bermejo, G., Audebert, F., Morandini, A. C. (2020c). Taxonomy and 18S rDNA-based phylogeny of *Henneguya multiradiatus* n. sp. (Cnidaria: Myxobolidae) a parasite of *Brochis multiradiatus* from Peruvian Amazon. *Microbial Pathogenesis*, 147, 104372.
- Matos, E., Tajdari, J., Azevedo, C. (2005). Ultrastructural studies of *Henneguya rhamdia* n. sp. (Myxozoa) a parasite from the Amazon teleost fish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(6), 532-537.

- Miller, M., Pfeiffer, W. T., Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees. In: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop, 14*, 1-8.
- Mills, D., Vevers, G. (1989). The Tetra encyclopedia of freshwater tropical aquarium fishes. New Jersey: Tetra Press, 208 p.
- Morsy, K., Abdel-Ghaffar, F., Bashtar, A. R., Mehlhorn, H., Al-Quraishy, S., Abdel-Gaber, R. (2012). Morphology and small subunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya suprabranchiae* (Myxozoa), a parasite of the catfish *Clarias gariepinus* (Clariidae) from the River Nile, Egypt. *Parasitology Research*, *111*(4), 1423-1435.
- Müller, M. I., Naldoni, J., Corrêa, L. L., Adriano, E. A. (2022). Two novel species of *Myxobolus* parasitizing the gills of *Semaprochilodus insignis* in the Brazilian Amazon, *Microbial Pathogenesis*, *165*(05464).
- Naldoni, J., Arana, S., Maia, A. A., Ceccarelli, P. S., Tavares, L. E., Borges, F. A., Pozo, C. F., Adriano, E. A. (2009). *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a South American catfish: histopathology and ultrastructure. *Veterinary Parasitology*, *166*(1-2), 52-59.
- Naldoni, J., Arana, S., Maia, A. A., Silva, M. R., Carriero, M. M., Ceccarelli, P. S., Tavares, L. E., Adriano, E. A. (2011). Host-parasite-environment relationship, morphology and molecular analyses of *Henneguya eirasi* n. sp. parasite of two wild *Pseudoplatystoma* spp. in Pantanal Wetland, Brazil. *Veterinary Parasitology*, *177*(3-4), 247-255.
- Naldoni, J., Maia, A. A., da Silva, M. R., Adriano, E. A. (2014). *Henneguya cuniculator* sp. nov., a parasite of spotted sorubim *Pseudoplatystoma corruscans* in the São Francisco Basin, Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms*, *107*(3), 211-221.
- Naldoni, J., Maia, A., Correa, L. L., Silva, M., Adriano, E. A. (2018). New myxosporeans parasitizing *Phractocephalus hemiliopterus* from Brazil: morphology, ultrastructure and SSU-rDNA sequencing. *Diseases of Aquatic Organisms*, *128*(1), 37-49.
- Negrelli, D. C., Vieira, D., Tagliavini, V. P., Abdallah, V. D., de Azevedo, R. K. (2019). Molecular and morphological analysis of *Henneguya jundiai* n. sp. (Cnidaria: Myxosporea), a new parasite of the gills of *Rhamdia quelen* in Brazil. *Acta Tropica*, *197*, 105053.

- Nemeczek, A. (1926). Beitrage zur Kenntnis der Myxosporidien fauna Brasiliens. *Archiv für Protistenkunde*, 54, 137-149.
- Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J. L. (2015). An introduction to myxozoan evolution, ecology and development. In: Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J. L. *Myxozoan evolution, ecology and development*. Cham: Springer, pp. 1-20.
- Pinto, C. (1928). *Myxobolus noguchii*, *M. stokesi* e *Henneguya iheringi*, especies novas de Myxosporídeos de peixes de água doce do Brasil. *Boletim Biológico*, 12, 41-43.
- Pote, L. M., Hanson L. A. Shivaji, R. (2000). Small Subunit Ribosomal RNA Sequences Link the Cause of Proliferative Gill Disease in Channel Catfish to *Henneguya* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea). *Journal of Aquatic Animal Health*, 12(3), 230-240.
- Rambaut, A. (2014). FigTree 1.4. 2 software. Institute of Evolutionary Biology, University Edinburgh.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Vieira, D., Tagliavini, V. P., Abdallah, V. D., de Azevedo, R. K. (2018). *Myxobolus imparfinis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea), a new gill parasite of *Imparfinis mirini* Haseman (Siluriformes: Heptapteridae) in Brazil. *Systematic Parasitology*, 95(2-3), 309-318.
- Vieira, D., Narciso, R. B., Azevedo, R. K., da Silva, R. J. (2022). Description of Two Novel *Henneguya* (Cnidaria: Myxosporea) Infecting Curimatid Fish, Using Morphological, Histological, and Molecular Analyses. *Acta Parasitologica*, 67(1), 233-243.
- Zatti, S. A., Naldoni, J., Silva, M. R., Maia, A. A., Adriano, E. A. (2015). Morphology, ultrastructure and phylogeny of *Myxobolus curimatae* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) a parasite of *Prochilodus costatus* (Teleostei: Prochilodontidae) from the São Francisco River, Brazil. *Parasitology International*, 64(5), 362-368.
- Zatti, S. A., Arana, S., Maia, A. A., Adriano, E. A. (2016). Ultrastructural, ssrDNA sequencing of *Myxobolus prochilodus* and *Myxobolus porofilus* and details of the interaction with the host *Prochilodus lineatus*. *Parasitology Research*, 115(12), 4573-4585.

Zatti, S. A., Atkinson, S. D., Maia, A., Corrêa, L. L., Bartholomew, J. L., Adriano, E. A. (2018). Novel *Myxobolus* and *Ellipsomyxa* species (Cnidaria: Myxozoa) parasiting *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin, Brazil. *Parasitology International*, 67(5), 612-621.

9. Capítulo V

Primeiro registro de *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* (Microsporidia) em peixe serrasalmídeo coletado no rio Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil

Resumo

Os microsporídios possuem tendência em parasitar os peixes, portanto algumas espécies podem provocar doenças em seus hospedeiros e conseqüentemente ocorrer grandes perdas econômicas. Há poucos registros de espécies de microsporídios em peixes coletados no Brasil. Sendo assim por meio das informações obtidas das análises morfométricas e ultraestruturais, identificamos *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* que estava parasitando a gônada de *Serrasalmus maculatus* proveniente do rio Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. Baixa prevalência de infecção (4,5%) para este parasito foi observado. Plasmódios arredondados e esbranquiçados no ovário do hospedeiro tinham esporos ovais a piriformes dentro de vacúolos parasitóforos, medindo $7,1 \pm 0,4$ (6,2-7,9) μm de comprimento e $4,1 \pm 0,3$ (3,5-4,9) μm de largura e tubo polar contendo 26-28 voltas. Este é o primeiro registro de espécie do gênero *Ovipleistophora* no Brasil e em peixe serrasalmídeo.

Palavras-chave: Brasil, gônada, parasito, peixe, São Paulo, rio Tietê.

Abstract

Microsporidia have a tendency to parasitize fish, so some species can cause diseases in their hosts and consequently cause great economic losses. There are few records of microsporidia species in fish collected in Brazil. Thus, through the information obtained from morphometric and ultrastructural analyses, we identified *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* which was parasitizing the gonad of *Serrasalmus maculatus* from the Tietê River, municipality of Ibitinga, São Paulo State, Brazil. Low prevalence of infection (4.5%) for this parasite was observed. Rounded and whitish plasmodia in the host ovary had oval to pyriform spores inside parasitophorous vacuoles, measuring 7.1 ± 0.4 (6.2-7.9) μm long and 4.1 ± 0.3 (3.5-4.9) μm wide and polar tube containing 26-28 turns. This is the first record of a species of the genus *Ovipleistophora* in Brazil and in serrasalmid fish.

Keywords: Brazil, fish, gonad, parasite, São Paulo, Tietê River.

1. Introdução

Microsporídios são parasitos intracelulares obrigatórios e estão relacionados aos fungos (Lom e Nilsen, 2003; Lee et al., 2008; Han e Weiss, 2017; Bass et al., 2018). Espécies de microsporídios parasitam diversos tipos de tecidos, órgãos e/ou células de hospedeiros invertebrados e vertebrados, sendo encontrados parasitando principalmente os artrópodes e peixes (Franzen, 2008; Cali e Takvorian, 2014). Algumas espécies de microsporídios são comuns por causarem doenças em peixes selvagens e de cultivo podendo gerar grandes perdas econômicas devido a morte desses hospedeiros (Lom e Dyková, 1992; Lom e Nilsen, 2003; Dyková, 2006).

O filo Microsporidia Balbiani, 1882 possui aproximadamente 1300 espécies distribuídas pelo mundo e mais de 220 gêneros são conhecidos (Stentiford et al., 2013; Vávra e Lukeš, 2013; Fayer e Santin-Duran, 2014; Weiss e Becnel, 2014; Park e Poulin, 2021). Entre os microsporídios de peixes há aproximadamente 21 gêneros com mais de 160 espécies descritas (Stentiford et al., 2013; Kent et al., 2014).

Mesmo que diversas espécies de microsporídios sejam conhecidas, a diversidade desse grupo ainda é subnotificada (Liu et al., 2019). Estudos de microsporídios em peixes no Brasil ainda são escassos e somente algumas espécies foram relatadas: *Amazonspora hassar* Azevedo e Matos 2003, *Kabatana rondoni* Casal, Matos, Teles-Grilo e Azevedo, 2010, *Loma myrophis* Azevedo e Matos, 2002, *L. psittaca* Casal, Matos, Teles-Grilo e Azevedo, 2009, *Microgemma carolinus* Casal, Matos, Garcia, Al-Quraishy e Azevedo, 2012, *Microsporidium brevirostris* Matos e Azevedo, 2004, *M. girardini*, Sprague, 1977, *Nucleospora braziliensis* Rodrigues, Francisco, David, Silva e Araújo Júnior, 2017, *P. beebei* Casal, Matos, Rocha, Sideaux, Al-Quraishy e Azevedo, 2016, *P. hypheobryconis* Schäperclaus 1941, *Potaspora morhaphis* Casal, Matos, Teles-Grilo e Azevedo, 2008, *P. aequidens* Videira, Casal, Rocha, Gonçalves, Azevedo, Velasco e Matos, 2015 e *Spraguea gastrophysus* Casal, Clemente, Matos, Knoff, Matos, Abdel-Baki e Azevedo, 2012 (Sprague, 1977; Azevedo e Matos 2002, 2003; Lom, 2002; Matos e Azevedo, 2004; Casal et al., 2008, 2009, 2010, 2012a,b, 2016; Videira et al., 2015; Winters et al., 2016; Rodrigues et al., 2017).

Usando dados morfológicos, morfométricos e ultraestruturais pode-se obter um conjunto de características para identificar a presente espécie pertencente ao microsporídio *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* que estava infectando o ovário de *S. maculatus* coletado no rio Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil.

2. Material e Métodos

Vinte e dois espécimes de *S. maculatus* foram coletados no rio Tietê (21°51'02.3"S 48°56'36.9"W), no município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil entre junho e setembro de 2018. Os peixes foram submetidos à narcose que foi induzida utilizando Eugenol (óleo de cravo) e sacrificados através do método físico de secção medular com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA n° 1109) da Universidade Estadual Paulista/UNESP. Os peixes foram mantidos em freezer no Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (LAPAS), UNESP/Botucatu até o momento das necropsias. A análise parasitológica consistiu na observação de todos os órgãos internos e superfície, brânquias e nadadeiras utilizando estereomicroscópio.

Plasmódios coletados do ovário do peixe foram montados entre lâmina e lamínula e rompidos manualmente para visualização no microscópio com contraste de interferência diferencial (DIC) (Leica DMLB 5000, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) com amplificação de 1000×. Imagens e medidas em micrômetros (µm) foram obtidas com o software LAS v. 3.8 (Leica Microsystems).

Para a análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET), a amostra do ovário contendo o microsporídio foi fixada em glutaraldeído, em tampão de fosfato 0,1 M e pH 7,3. As amostras foram imersas em tetróxido de ósmio, coradas em bloco com acetato de uranila e incorporado na resina. Cortes semifino e ultrafino da amostra foram realizados. Após, a amostra foi contrastada com citrato de chumbo e inserida sobre grades de cobre. As grades com a amostra foram examinadas sob o microscópio eletrônico de transmissão MET (Tecnai™ Spirit TEM) no Centro de Microscopia Eletrônica (CME), Instituto de Biociências (IBB), UNESP, Botucatu.

3. Resultados

Plasmódios foram coletados do ovário de 1 de 22 (4,5%) espécimes de *S. maculatus* analisados. Após rompimento dos plasmódios foi possível observar diversos esporos livres e agrupados dentro de vacúolos parasitóforos. Comparação morfométrica dos esporos de *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* com esporos de *Ovipleistophora* spp. que parasitam gônada de peixes está disponível na **Tabela 1**.

Tabela 1. Comparação das características morfométricas dos esporos das espécies de microsporídios do gênero *Ovipleistophora* que parasitam as gônadas de peixes. Comprimento do esporo (CE), largura do esporo (LE), ^a= microesporos, ^b= macroesporos, localidade geográfica (LG). Os valores estão representados em micrômetros (µm) e estão expressados por média ± desvio padrão. O intervalo dos valores mínimo e máximo estão entre parênteses.

Espécies	CE	LE	Hospedeiros	LG	Referências
<i>Ovipleistophora</i> cf. <i>O. ovariae</i>	7,1±0,4 (6,2-7,9)	4,1±0,3 (3,5-4,9)	<i>Serrasalmus maculatus</i> Kner, 1858	Brasil	Presente estudo
<i>O. ovariae</i> (Summerfelt, 1964)	7,4±0,9	4,3±0,4	<i>Pimephales promelas</i> Rafinesque, 1820	EUA	Hoffman e Nagel (1977)
<i>O. ovariae</i>	8,4±0,2 ^a 6,4±0,1 ^b	4,2±0,1 ^a 3,4±0,1 ^b	<i>Notemigonus crysoleucas</i> (Mitchill, 1814)	EUA	Summerfelt (1964) e Phelps e Goodwin (2008)
<i>O. mirandellae</i> Vaney e Conte, 1901	12,0 ^a 7,5 ^b	6,0 ^a 4,0 ^b	<i>Alburnus mirandella</i> Blanchard, 1866	França	Vaney e Conte (1901) e Pekkarinen et al. (2002)

3.1. Resumo taxonômico

Filo Microsporidia Balbiani, 1882

Classe Microsporea Levin e Corliss, 1963

Família Pleistophoridae Doflein, 1901

Gênero *Ovipleistophora* Pekkarinen, Lom e Nilsen, 2002

Espécie *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae*

Esporos: plasmódios (**Figura 1A**) esbranquiçados e redondos medindo ~0,8 mm foram observados no ovário de *S. maculatus*. Esporos maduros de *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* (**Figura 1B**) têm formato oval a piriforme medindo $7,1 \pm 0,4$ (6,2-7,9) μm de comprimento e $4,1 \pm 0,3$ (3,5-4,9) μm de largura. O tubo polar possui de 26 a 28 voltas.

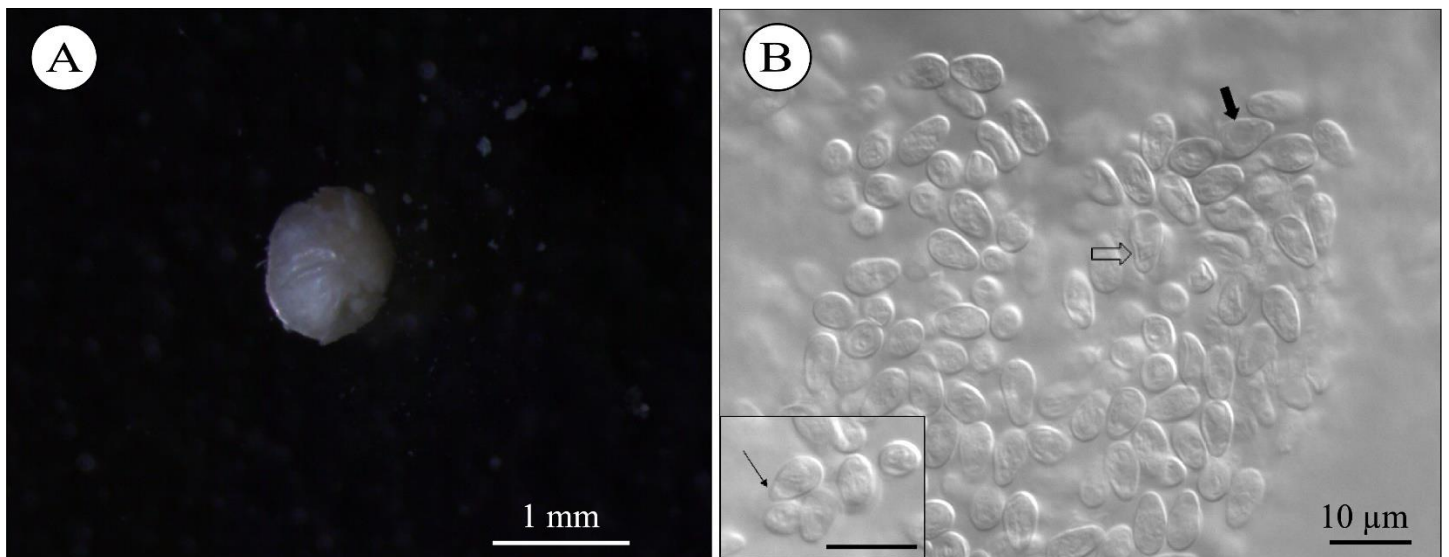


Figura 1. Fotomicrografia do plasmódio e esporos de *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* coletado do ovário de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 oriundo do rio Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil **A.** Plasmódio coletado do ovário. **B.** Esporos de *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae*, no qual a seta preenchida está indicando o vacúolo posterior e a seta aberta está indicando algumas voltas do tubo polar. Em destaque observamos o disco de ancoragem (seta fina). Barra de escala: 10 μm .

3.2. Análise ultraestrutural

Esporos maduros isolados e agrupados de *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* dentro de vacúolos parasitóforos são observados na análise ultraestrutural (**Figura 2A**). Conforme as principais características do espora apontadas na **Figura 2B** indicam

pertencer a espécie correspondente ao filo Microsporidia e ao gênero *Ovipleistophora*. Não foi possível observar outros estágios de desenvolvimento dos esporos de *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae*, tais como os merontes, esporontes e esporoblastos.

A parede do esporo está organizada por duas camadas de densidades diferentes: exoesporo elétron-denso com ornamentações por toda superfície e endosporo elétron-lucente (**Figura 2C**). O tubo polar com camadas concêntricas é composto por 26 a 28 voltas com duas a quatro fileiras ocupando mais que a metade do esporo e alinhado ao redor do vacúolo posterior (**Figura 2D-E**).

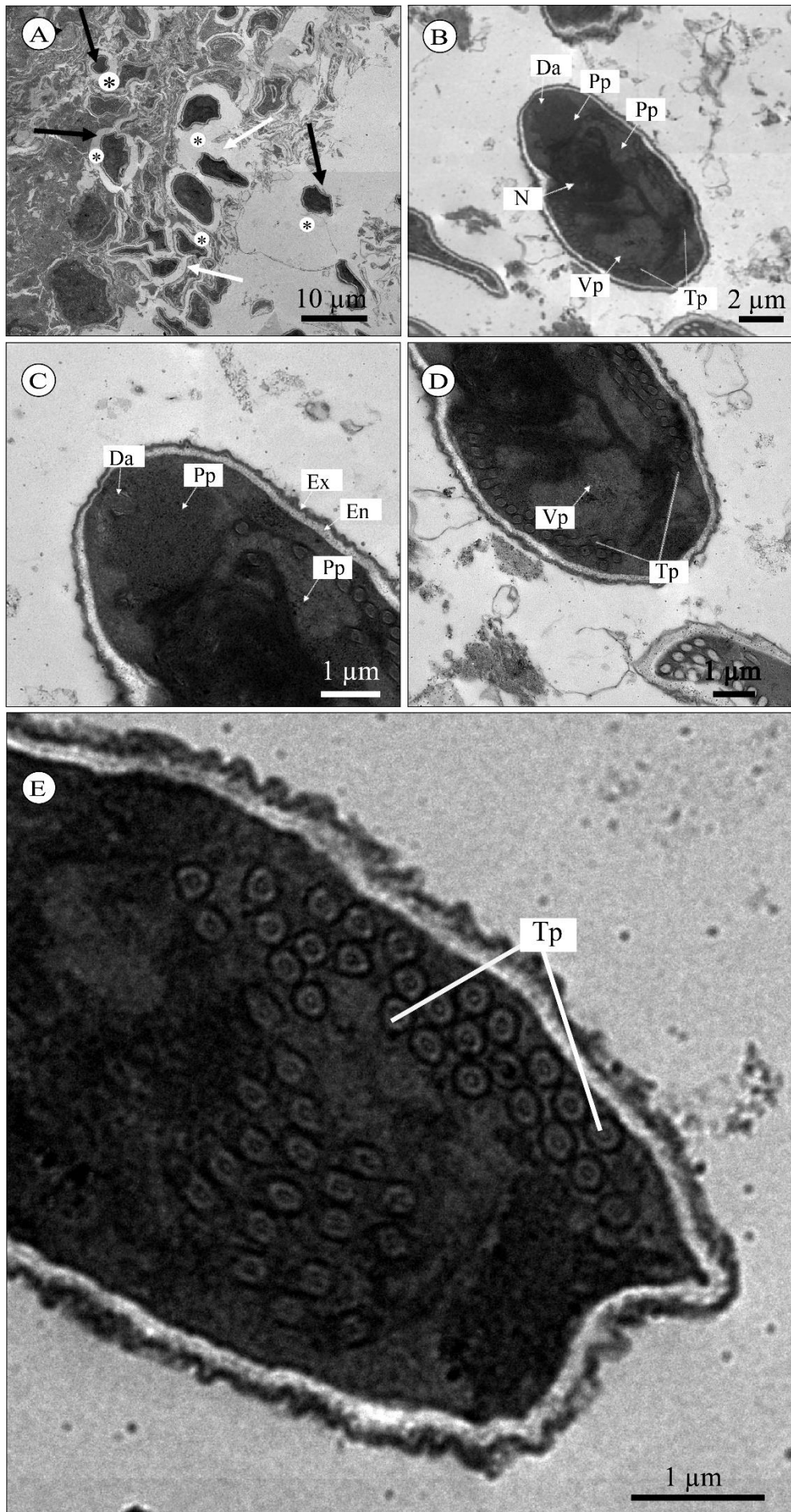


Figura 2. Análise ultraestrutural dos esporos de *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* coletado do ovário de *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 proveniente do rio Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo, Brasil. **A.** Ultraestrutura dos esporos isolados (setas pretas) e agrupados (setas brancas) dentro de vacúolos parasitóforos (*) em diferentes visões. **B.** Esporo com as principais características: disco de ancoragem (Da), polaroplasto (Pp), núcleo (N), vacúolo posterior (Vp) e tubo polar (Tp). **C.** Seção ultrafina da região anterior do espora mostrando o disco de ancoragem (Da), polaroplasto (Pp) e a parede constituída por exospora (Ex) e endospora (En). **D.** Seção ultrafina da região posterior do espora indicando o vacúolo posterior (Vp) e tubo polar (Tp). **E.** Seção ultrafina da região posterior mostrando os tubos polares (Tp).

4. Discussão

Esporos de *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* foram comparados com os esporos das espécies do gênero *Ovipleistophora* que também parasitam as gônadas de peixes e mostrou a mesma morfometria dos esporos correspondente a espécie *O. ovariae* registrada parasitando *P. promelas* (Tabela 1).

Há apenas duas espécies de microsporídeo (*M. girardini* e *N. braziliensis*) descritas no estado de São Paulo, Brasil, mas os esporos de *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* relatada aqui são maiores quando comparados com os esporos de *M. girardini* e *N. braziliensis*, portanto a partir das características morfológicas e morfométricas não correspondem pertencerem a mesma espécie (Sprague, 1977; Rodrigues et al., 2017).

Em outros países existem registros das seguintes espécies de microsporídios parasitando espécies de peixes da ordem Characiformes: *P. hypheobryconis* parasitando *Paracheirodon innesi* Myers, 1936 e *Fusasporis stethaprioni* Lovy, Yanong, Stiwell, Waltzek, Shelley, Pouder, Wolf e Camus, 2021 parasitando os hospedeiros *Gymnocorymbus ternetzi* Boulenger, 1895 e *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 (Lovy et al., 2021). Porém, os esporos dessas espécies também são menores quando comparados com esporos de *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* relatada neste estudo, mostrando que são espécies distintas.

Os microsporídios podem infectar diversos órgãos dos peixes (Lom e Dyková, 1992). Porém, algumas espécies de microsporídios podem ter especificidade pelo órgão ou tecido do hospedeiro, ficando agrupadas em cada gênero correspondente. Casal et al. (2010) já haviam relatado que as espécies pertencentes ao gênero *Microgemma* parasitam

principalmente o fígado, espécies de *Spraguea* parasitam principalmente o tecido nervoso, espécies de *Kabatana* e *Pleistophora* parasitam principalmente o músculo esquelético, espécies de *Loma* parasitam principalmente as brânquias e espécies de *Ovipleistophora* estão registradas nas gônadas e outros órgãos dos peixes.

Infelizmente não obtivemos êxito na amplificação do gene *ssrDNA* para a espécie *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae*, portanto não foi possível realizar as análises moleculares e as relações filogenéticas com outras espécies de microsporídios. Sendo assim, estudos futuros sobre a relação filogenética entre as espécies de microsporídios serão necessários para complementar as informações das características de especificidade do órgão infectado.

Matos et al. (2003) e Diamant et al. (2014) já haviam relatado que os microsporídios que parasitam as gônadas dos peixes podem causar inflamações severas, prejudicando a reprodução das espécies. Sendo assim, espécies de microsporídios nas gônadas podem reduzir a fecundidade dos peixes, especialmente quando a infecção é intensa e, conseqüentemente, essa infecção reflete no declínio da espécie hospedeira (Schuster et al., 2022).

Este estudo contribui para novas informações sobre a biodiversidade de microsporídios de peixes, pois este é o primeiro registro de espécie de microsporídio em peixe do gênero *Serrasalmus* e na localidade geográfica estudada (rio Tietê, município de Ibitinga, estado de São Paulo), assim como, o primeiro registro de espécie de *Ovipleistophora* em espécie de peixe da família Serrasalminidae e ordem Characiformes. Este também é o primeiro registro de espécie de *Ovipleistophora* parasitando peixe coletado no Brasil.

5. Referências

- Azevedo, C., Matos, E. (2002). Fine structure of a new species, *Loma myrophis* (Phylum Microsporidia), parasite of the Amazonian fish *Myrophis platyrhynchus* (Teleostei, Ophichthidae). *European Journal of Protistology*, 37, 445-452.
- Azevedo, C., Matos, E. (2003). *Amazonspora hassar* n. gen. and n. sp. (phylum Microsporidia, fam. Glugeidae), a parasite of the Amazonian teleost *Hassar orestis* (fam. Doradidae). *The Journal of parasitology*, 89(2), 336-341.
- Bass, D., Czech, L., Williams, B. A. P., Berney, C., Dunthorn, M. (2018). Clarifying the relationships between Microsporidia and Cryptomycota. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 65, 773-782.
- Cali, A., Takvorian, P. M. (2014). Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. In: Weiss, L. M., Becnel, J. J. *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. Wiley Blackwell, pp. 71-133.
- Casal, G., Matos, E., Teles-Grilo, M. L., Azevedo, C. (2008). A new microsporidian parasite, *Potasporea morhaphis* n. gen., n. sp. (Microsporidia) infecting the Teleostean fish, *Potamorhaphis guianensis* from the River Amazon. Morphological, ultrastructural and molecular characterization. *Parasitology*, 135(9), 1053-1064.
- Casal, G., Matos, E., Teles-Grilo, M. L., Azevedo, C. (2009). Morphological and genetical description of *Loma psittaca* sp. n. isolated from the Amazonian fish species *Colomesus psittacus*. *Parasitology Research*, 105(5), 1261-1271.
- Casal, G., Matos, E., Teles-Grilo, L., Azevedo, C. (2010). Ultrastructural and molecular characterization of a new microsporidium parasite from the Amazonian fish, *Gymnorhamphichthys rondoni* (Rhamphichthyidae). *The Journal of Parasitology*, 96(6), 1155-1163.
- Casal, G., Matos, E., Garcia, P., Al-Quraishy, S., Azevedo, C. (2012a). Ultrastructural and molecular studies of *Microgemma carolinus* n. sp. (Microsporidia), a parasite of the fish *Trachinotus carolinus* (Carangidae) in Southern Brazil. *Parasitology*, 139(13), 1720-1728.
- Casal, G., Clemente, S. C. S., Matos, P., Knoff, M., Matos, E., Abdel-Baki, A. A., Azevedo, C. (2012b). Redefining the genus *Spraguea* based on ultrastructural and phylogenetic data from *Spraguea gastrophysus* n. sp. (Phylum Microsporidia), a

- parasite found in *Lophius gastrophysus* (Teleostei) from Brazil. *Parasitology Research*, 111(1), 79-88.
- Casal, G., Matos, E., Rocha, S., Sindeaux-Neto, J., Al-Quraishy, S., Azevedo, C. (2016). Ultrastructure and Phylogeny of *Pleistophora beebei* sp. nov. (Microsporidia) Infecting the Amazonian Teleostean *Brachyhypopomus beebei* (fam. Hypopomidae). *Acta Protozoologica*, 55, 231-240.
- Diamant, A., Rothman, S. B., Goren, M., Galil, B. S., Yokes, M. B., Szitenberg, A., Huchon, D. (2014). Biology of a new xenoma-forming gonadotropic microsporidium in the invasive blotchfin dragonet *Callionymus filamentosus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 109, 35-54.
- Dyková, I. (2006). Phylum Microspora. In: Woo, P. T. K. Fish Diseases and Disorders, protozoan and metazoan infections. UK: CABI Publishing, 205-229.
- Fayer, R., Santin-Duran, M. (2014). Chapter 3. Epidemiology of Microsporidia in humans. In: Weiss, L., Becnel, J. J. *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. Hoboken: Wiley-Blackwell, pp. 135-164.
- Franzen, C. (2008). Microsporidia: A Review of 150 Years of Research. *The Open Parasitology Journal*, 2, 1-34.
- Han, B., Weiss, L. M. (2017) Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiology Spectrum*, 5.
- Hoffman, G. L., Nagel, M. L. (1977). A New Host for *Pleistophora ovariae* (Microsporida). *The Journal of Parasitology*, 63(1), 160-162.
- Kent, M. L., Shaw, R. W., Sanders, J. L. (2014) Microsporidia in fish. In: Weiss, L. M., Becnel, J. J. *Microsporidia pathogens of opportunity*. Ames: Wiley Blackwell, pp 493-520.
- Lee, S. C., Corradi, N., Byrnes, E. J., Torres-Martinez, S., Dietrich, F. S., Keeling, P. J., Heitman, J. (2008) Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Current Biology*, 1, 1675-1679.
- Liu, X. H., Stentiford, G. D., Voronin, V. N., Sato, H., Li, A. H., Zhang, J. Y. (2019). *Pseudokabatana alburnus* n. gen. n. sp., (Microsporidia) from the liver of top mouth culter *Culter alburnus* (Actinopterygii, Cyprinidae) from China. *Parasitology Research*, 118, 1689-1699.
- Lom J., Dyková I. (1992). Microsporidia (Phylum Microspora Sprague, 1977). In: Lom J., Dyková I., Protozoan Parasites of Fishes. *Developments in Aquaculture and Fisheries Sciences*, 26. Amsterdam: Elsevier, 125-157.

- Lom, J. (2002). A catalogue of described genera and species of microsporidians parasitic in fish. *Systematic Parasitology*, 53, 81-99.
- Lom, J., Nilsen, F. (2003). Fish microsporidia: fine structural diversity and phylogeny. *International Journal for Parasitology*, 33(2), 107-127.
- Lovy, J., Yanong, R., Stilwell, J. M., Waltzek, T. B., Shelley, J. P., Pouder, D. B., Wolf, J. C., Camus, A. C. (2021). Tetra disseminated microsporidiosis: a novel disease in ornamental fish caused by *Fusasporis stethaprioni* n. gen. n. sp. *Parasitology Research*, 120(2), 497-514.
- Matos, E., Matos, P., Casal, G., Giese, E., Corral, L., Azevedo, C. (2003). Dados ultra-estruturais de esporos de microsporídios (Phylum Microsporídia) da fauna ictiológica da região amazônica. *Revista de Ciências Agrárias*, 39, 95-108.
- Matos, E. Azevedo, C. (2004). Ultrastructural description of *Microsporidium brevirostris* sp. n., parasite of the teleostean *Brachyhyopomus brevirostris* Hypopomidae from the Amazon River. *Acta Protozoologica*, 43(3), 261-267.
- Park, E., Poulin, R. (2021). Revisiting the phylogeny of microsporidia. *International Journal for Parasitology*, 51 (10), 855-864.
- Pekkarinen, M., Lom, J., Nilsen, F. (2002). *Ovipleistophora* gen. n., a new genus for *Pleistophora mirandellae*-like microsporidia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48(2), 133-142.
- Phelps, N. B. D., Goodwin, A. E. (2008). Vertical transmission of *Ovipleistophora ovariae* (Microspora) within the eggs of the Golden Shiner. *Journal of Aquatic Animal Health*, 20, 45-53.
- Rodrigues, M. V., Francisco, C. J., David, G. S., Silva, R. J., Araújo Júnior, J. P. (2017). A new micro-sporidium species, *Nucleospora braziliensis* n. Sp., infecting Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from brazilian aquaculture. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 5(1), 496-505.
- Schuster, C. J., Sanders, J. L., Couch, C., Kent, M. L. (2022). Recent Advances with Fish Microsporidia. *Experientia Supplementer*, 114, 285-317.
- Sprague, V. (1977) Systematics of the microsporidia. In: Bulla, L. A., Cheng T. C. Comparative Pathobiology. New York: Plenum Press, pp. 1-510.
- Stentiford, G. D., Feist, S. W., Stone, D. M., Bateman, K. S., Dunn, A. M. (2013). Microsporidia: diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems. *Trends in Parasitology*, 29(11), 567-578.

- Summerfelt, R. C. (1964) A new microsporidian parasite from the golden shiner *Notemigonus crysoleucas*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 93(1), 6-10.
- Vaney, C., Conte, A. (1901). Sur une nouvelle Microsporidie, *Pleistophora mirandellae*, parasite de Tovaire d' *Alburnus mirandella* Branch. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, 233, 644-646.
- Vávra, J., Lukeš, J. (2013). Microsporidia and 'the art of living together'. *Advances in Parasitology*, 82, 253-319.
- Videira, M., Casal, G., Rocha, S., Gonçalves, E., Azevedo, C., Velasco, M., Matos, E. R. (2015). *Potaspora aequidens* n. sp. (Microsporidia, Tetramicridae), a parasite infecting the freshwater fish *Aequidens plagiozonatus* (Teleostei, Cichlidae) from Brazil. *Parasitology Research*, 114(7), 2435-2442.
- Weiss, L. M., Becnel, J. J. (2014). *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition*. Wiley-Blackwell.
- Winters, A., Langohr, I., Souza, M., Colodel, E., Soares, M., Faisal, M. (2016). Ultrastructure and molecular phylogeny of *Pleistophora hypheobryconis* (Microsporidia) infecting hybrid jundiara (*Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum*) in a Brazilian aquaculture facility. *Parasitology*, 143(1), 41-49.

10. Considerações finais

Em relação aos 105 espécimes de peixes analisados correspondente as espécies de *Serrasalmus* sp., *S. maculatus*, *P. avanhandavae*, *P. gracilis*, *R. quelen* e *A. ocellatus*, 21 espécimes estavam parasitados, ou seja, 20% dos espécimes analisados estavam com pelo menos uma espécie de microparasito. As espécies de microparasitos encontradas nos peixes analisados para este estudo correspondem a uma espécie de *Calyptospora*, no qual pertence ao filo Apicomplexa e ao grupo coccídeo, uma espécie de *Ovipleistophora* que representa membros do filo Microsporidia, cinco espécies de *Henneguya* e seis espécies de *Myxobolus* correspondentes aos mixozoários parasitos e pertencentes ao filo Cnidaria.

Calyptospora cf. *C. gonzaguensis* estava parasitando o tecido hepático de *S. maculatus* e com base na análise histopatológica pode-se concluir que esta espécie estava causando coccidiose hepática no hospedeiro. *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* estava infectando a gônada de *S. maculatus* e espécies de microsporídios que infectam a gônada pode apresentar o potencial de reduzir a fecundidade dos peixes, causando diversos prejuízos econômicos. Espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* que estavam parasitando o estômago, brânquias, rim, coração, nadadeiras e barbilhão de espécimes de *Serrasalmus* sp., *S. maculatus* e *P. gracilis* foram identificadas como novas espécies a partir dos aspectos morfológicos dos mixoesporos e por meio das análises moleculares e filogenéticas do gene *ssrDNA*.

Ao total foram 13 espécies de microparasitos encontrados e quanto aos seus respectivos hospedeiros, pode-se observar que 33,3% dos espécimes de *S. maculatus* analisados estavam parasitados e 10,9% dos espécimes de *P. gracilis* analisados também estavam parasitados. A análise parasitológica mostrou que espécimes de *R. quelen* coletados nos rios Jacaré-Pepira e Jacaré-Guaçu e espécimes de *A. ocellatus* coletados nos rios Jacaré-Guaçu e Tietê não estavam parasitados por espécies de microparasitos. Quanto a porcentagem dos espécimes de *S. maculatus* parasitados em relação a cada localidade que foram coletados, 18,2% dos espécimes coletados no rio Jacaré-Guaçu, 22,2% dos espécimes coletados no rio Jacaré-Pepira e 22,7% dos espécimes coletados no rio Tietê estavam parasitados.

Em relação as espécies de microparasitos e aos órgãos dos hospedeiros parasitados, das 13 espécies de microparasitos aqui registradas, 7 espécies foram coletadas das brânquias dos peixes. Visto que, 42,8% dos espécimes de *S. maculatus* e 80,0% dos espécimes de *P. gracilis* estavam com as brânquias parasitadas.

O conjunto de análises morfológicas, moleculares e filogenéticas contribuem para verificar a distinção das espécies de microparasitos deste estudo com as espécies já descritas anteriormente. Contribuindo com a descrição de 10 espécies novas de mixozoário de peixes correspondente aos gêneros *Henneguya* e *Myxobolus*. *Myxobolus imparfinis* já havia sido registrado parasitando *I. mirini* e *C. iheringi*. *Calyptospora* cf. *C. gonzaguensis* e *Ovipleistophora* cf. *O. ovariae* são espécies similares as espécies *C. gonzaguensis* e *O. ovariae*, respectivamente. Algumas espécies foram descritas apenas com dados morfológicos, portanto há necessidade futuramente de estudos complementares de ultraestrutura, molecular e/ou filogenético para a validação das espécies de microparasitos aqui relatadas.

Este estudo mostra a alta diversidade de microparasitos presentes em apenas quatro espécies de peixes correspondentes a *Serrasalmus* sp., *S. maculatus*, *P. avanhandavae* e *P. gracilis*, expandindo os conhecimentos sobre a biodiversidade parasitária de organismos aquáticos, principalmente em relação aos microparasitos de peixes.

11. Anexo



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu




Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "ESTUDO FILOGENÉTICO E MORFOLÓGICO DOS MIXOZOÁRIOS PARASITOS DE PEIXES PROVENIENTES DOS TRÊS PRINCIPAIS RIOS DA BACIA HIDROGRÁFICA DO TIETÊ/JACARÉ, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL", Protocolo nº 1109-CEUA, sob a responsabilidade de **Rodney Kozłowski de Azevedo**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**, nesta data.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 1/3/2019	Término: 1/3/2022
Espécie/linhagem:	Peixe <i>Rhamdia</i> , <i>Astronotus</i> , <i>Serrasalmus</i> , <i>Pimelodella</i>	
Nº de animais:	160	
Peso:	variável	Idade: variável
Sexo:	Macho e fêmea	
Origem	Rios Jacaré-Pepira, Tietê, Jacaré-Guaçu- Município de Ibitinga/SP. Autorização SISBIO: 55914-2	

Botucatu, 22 de fevereiro de 2019.


Prof. Assoc. Wellerson Rodrigo Scarano
Coordenador da CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Instituto de Biociências da Unesp - Câmpus de Botucatu
Rua Prof. Dr. Antonio Carlos Wagner Zúñiga, 355 - Distrito de Rubião Júnior - CEP 13628-900 Botucatu-SP