

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

**Diego Henrique Mirandola Dias Vieira**

ANÁLISES MORFOLÓGICAS DOS MIXOZOÁRIOS (MYXOZOA) PARASITOS  
PRESENTES EM TECIDO NERVOSO DE PEIXES COLETADOS NO RIO DO PEIXE,  
MÉDIO RIO TIETÊ, SP, BRASIL

**Botucatu**

**2013**

DIEGO HENRIQUE MIRANDOLA DIAS VIEIRA

ANÁLISES MORFOLÓGICAS DOS MIXOZOÁRIOS (MYXOZOA) PARASITOS  
PRESENTES EM TECIDO NERVOSO DE PEIXES COLETADOS NO RIO DO PEIXE,  
MÉDIO RIO TIETÊ, SP, BRASIL

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito para a  
obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas no Instituto de  
Biociências da Universidade  
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita  
Filho" - Campus de Botucatu.

**Orientador: Dr. Reinaldo José da Silva**

**Co-orientador: Rodney Kozlowiski de Azevedo**

**Botucatu**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Vieira, Diego Henrique Mirandola Dias.

Análises morfológicas dos mixozoários (Myxozoa) parasitos presentes em tecido nervoso de peixes coletados no Rio do Peixe, médio rio Tietê, SP, Brasil /  
Diego Henrique Mirandola Dias Vieira. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Reinaldo José da Silva

Coorientador: Rodney Kozlowiski de Azevedo

Capes: 21301026

1. Peixes - Doenças - Mortalidade. 2. Peixe, Rio do (SP). 3. Parasito. 4.  
Sistema Nervoso - Doenças.

Palavras-chave: Myxozoários; Rio do Peixe; Sistema Nervoso.

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus.*

*Aos meus pais, por me darem toda a base que eu precisei e sempre me apoiarem nas minhas decisões.*

*A Priscila Rezek Nunes pelo companheirismo e por me passar a confiança necessária.*

*Aos meus amigos, pelos momentos de descontração que se fizeram necessários.*

*Aos meus orientadores, que me ensinaram tudo o que eu sei e me deram o direcionamento necessário.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro fundamental para a realização deste trabalho. (Processo 2011/22292-8)*

*E a todos que de alguma forma contribuíram antes e durante a minha formação.*

## ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>25</b>

## RESUMO

Atualmente a biodiversidade dos ecossistemas marinhos e dulcícolas têm sido ameaçada, principalmente por problemas ambientais, resultantes da degradação dos ecossistemas. Um exemplo é o trecho do médio rio Tietê, onde a represa de Barra Bonita (SP) concentra praticamente toda a carga de efluentes orgânicos oriundos da região metropolitana de São Paulo, induzindo a eutrofização com a perda da qualidade da água. Nesta bacia hidrográfica localiza-se o rio do Peixe, um dos tributários da represa de Barra Bonita cujas nascentes estão nas encostas da Cuesta de Botucatu, apresentando num gradiente altitudinal, um bom estado de conservação ambiental e qualidade de águas, com uma rica biodiversidade de peixes associada à presença de inúmeras lagoas marginais. Sob outra óptica, os estudos relacionados com parasitos e outros patógenos de organismos aquáticos têm aumentado consideravelmente a relevância, principalmente daqueles hospedeiros com potencial para o cultivo e comercialização, face ao aumento significativo destas atividades no Brasil e no mundo. Entre os agentes responsáveis por doenças em peixes estão os mixosporídeos, que podem causar grandes prejuízos econômicos, com altas razões de mortalidade. Baseado no exposto, avaliamos neste estudo a biodiversidade dos mixosporídeos parasitos de três espécies de peixes, através da caracterização morfológica, devido à importância sócio-econômica deste rio para a região e grande diversidade de peixes.

**Palavras- chave:** Sistema nervoso, mixozoários, rio do Peixe.

## ABSTRACT

Currently the biodiversity of marine and freshwater ecosystems have been threatened, especially by environmental problems resulting from the degradation of ecosystems, an example is the stretch of the Middle Tietê River, where the Barra Bonita (SP) focuses almost the entire load of organic waste coming from the metropolitan region of São Paulo, inducing eutrophication with the loss of water quality. This basin is located the Fish River, a tributary of Barra Bonita whose sources are on the slopes of the Cuesta de Botucatu, presenting an altitudinal gradient in a good state of conservation and water quality, with a rich biodiversity of fish associated with the presence of many lagoons. From another perspective, the studies related to parasites and other pathogens of aquatic organisms have considerably increased the relevance, especially those with potential hosts for growing and marketing, given the significant increase in these activities in Brazil and worldwide. Among the agents responsible for diseases in fish are the myxosporean, which can cause significant economic damage, with high mortality ratios. Based on the above assessed in this study the biodiversity of myxosporean parasites of three species of fish, through morphological, due to socio-economic importance of this river to the region and great diversity of fish.

**Keywords:** nervous system, mixozoários, River Fish.

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem aumentado consideravelmente a relevância dos estudos relacionados com parasitos e outros patógenos de organismos aquáticos, principalmente daqueles hospedeiros com potencial para o cultivo e comercialização, face ao aumento significativo destas atividades no Brasil e no mundo (Luque, 2004). O ambiente aquático é um meio no qual o acesso à infecção por agentes patogênicos torna-se facilitado, assim o estudo dos agentes causadores de patologias nos peixes é um campo de crescente importância, pois sabe-se que estes agentes podem provocar elevadas taxas de mortalidade, redução das capturas ou diminuição dos valores comerciais dos exemplares atacados (Eiras, 1994). Entre os agentes responsáveis por doenças em peixes estão os mixosporídeos, que causam sérios prejuízos para as espécies de peixes economicamente importantes (Barassa *et al.*, 2003). Um potencial patogênico tem sido registrado em um grande número de mixozoários que podem afetar qualquer órgão do corpo do peixe e causar várias lesões. Espécies do gênero *Henneguya* e *Myxobolus* podem causar atrofia nos órgãos invadidos causada pelo crescimento dos grandes plasmódios. Contudo, mais de 1330 espécies de mixosporídeos têm sido registradas, e somente algumas são conhecidas por causar sérias ou fatais infecções, uma vez que tanto os mixosporídeos quanto seus hospedeiros estão adaptados um ao outro (Vita *et al.*, 2003).

A classe Myxosporea, pertence ao Filo Myxozoa e contém 62 gêneros (Griffin *et al.*, 2008). Os dois principais gêneros, da classe Myxosporea são *Myxobolus* e *Henneguya*. Algumas espécies infectam peixes que são economicamente importantes como recurso pesqueiro e outras infectam peixes cultiváveis, podendo causar grandes prejuízos econômicos, com altas razões de mortalidade. Os peixes são a principal fonte de proteína de várias populações na América do Sul. A alta demanda de peixes tem resultado em uma necessidade de extensivos estudos em peixes que tenham potencial para cultivo (Eiras *et al.*, 2010). Segundo Martins *et al.* (1999) a baixa qualidade da água e o estresse predis põem os peixes cultivados às infecções por estes mixozoários.

*Myxobolus* é o gênero com maior número de espécies dentro da classe Myxosporea. Estes parasitos infectam principalmente peixes, mas um pequeno número de espécies pode parasitar anfíbios e répteis. Eiras *et al.* (2005) realizaram uma sinopse do gênero e caracterizaram 744 espécies. No Brasil, existem 39 espécies descritas até o momento. A espécie mais estudada deste gênero é *M. cerebralis*, que provoca a “doença do rodopio” ou “doença da cauda negra”. A doença manifesta-se nos exemplares jovens. Se localizados na cartilagem, perto da cápsula auditiva provocam distúrbios natatórios característicos. Os

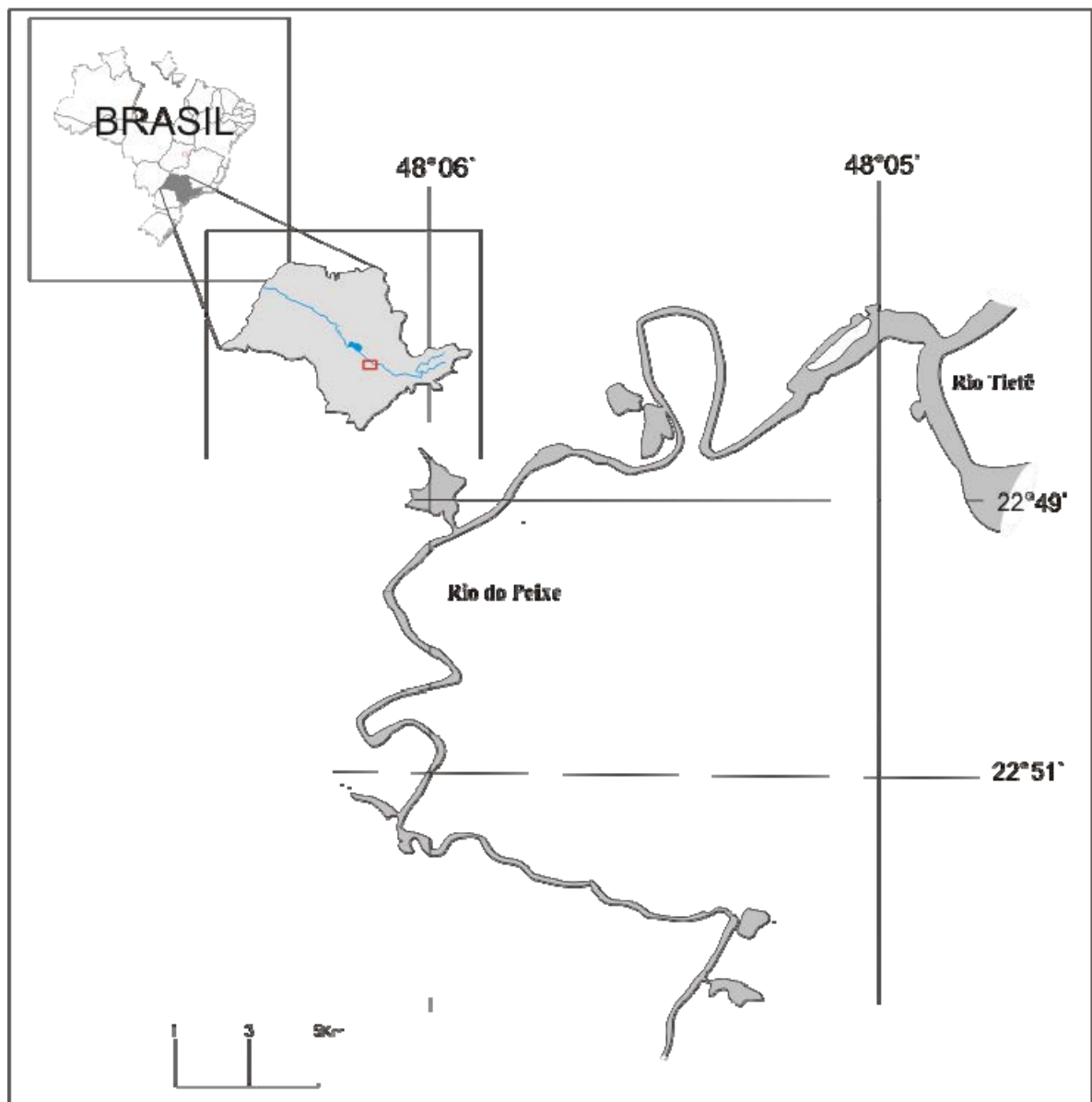
esporos quando estão localizados na cartilagem da coluna vertebral, numa zona posterior a 26ª vértebra, exercem pressão sobre os nervos caudais que controlam a pigmentação da cauda, ficando esta intensamente enegrecida. Esta doença está incluída na lista de doenças de peixes de declaração obrigatória nos países em que existe legislação sobre as mesmas (Eiras, 1994).

*Henneguya* é o segundo gênero em número de espécies dentro da classe Myxosporea. Apresenta uma ampla distribuição geográfica e infecta peixes marinhos e dulcícolas, mas na América do Sul, poucas são as espécies conhecidas. No Brasil existem 55 espécies descritas. Os cistos podem estar localizados no coração, cérebro, músculo, vesícula biliar, olhos, gônadas, sistema nervoso e outros locais, mas o local preferencial para a localização dos cistos são as brânquias nas formas intra e interlamelar. A presença de cistos nas brânquias associada com hiperplasia e inflamação aumenta a aderência entre as lamelas secundárias. Este fato, juntamente com a produção de muco pode causar a Síndrome Respiratória e o conseqüente sufocamento dos peixes. Algumas espécies podem causar grandes perdas econômicas, devido à dificuldade de comercialização dos peixes infectados.

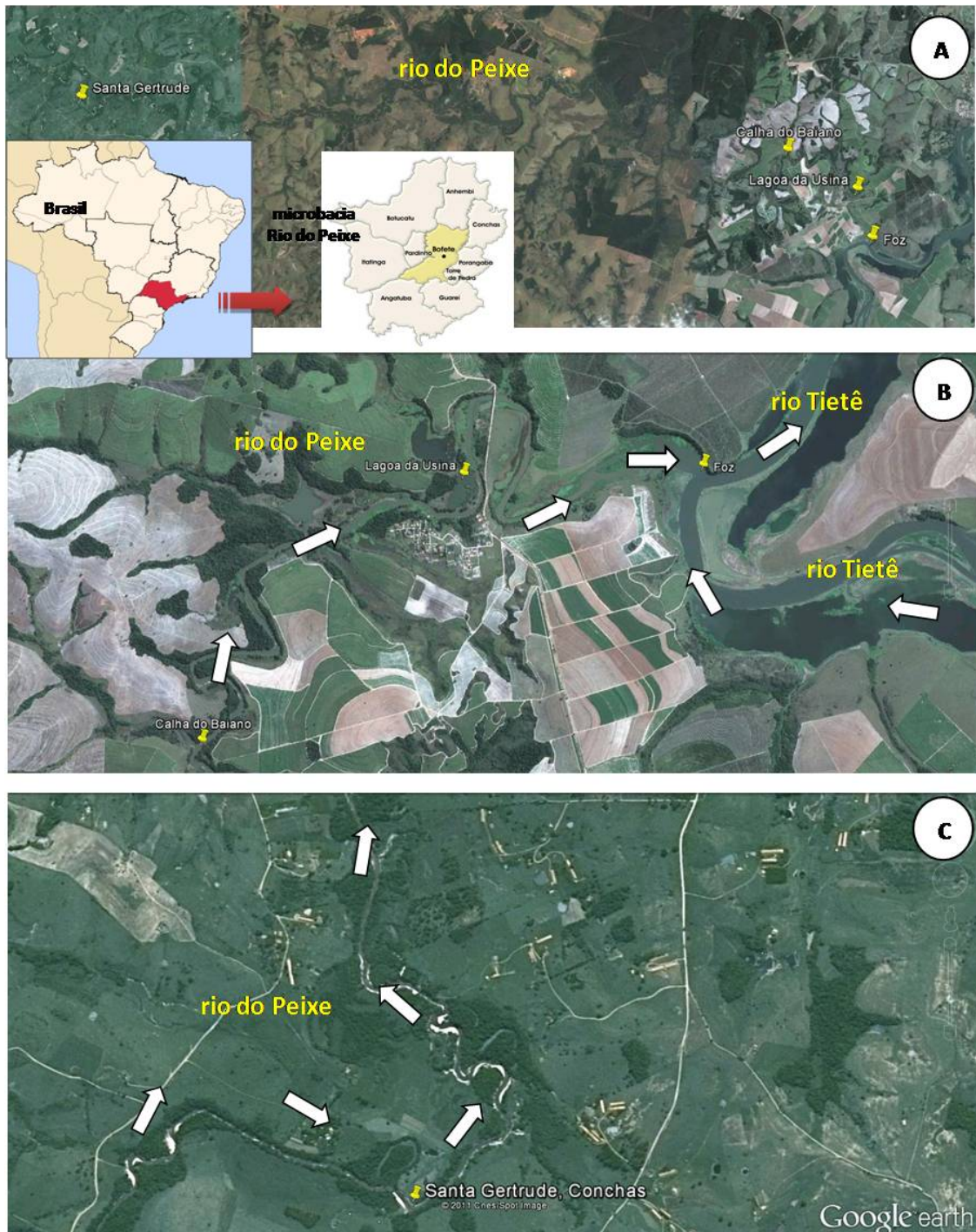
O rio do Peixe (Figuras 1, 2 e 3) tem suas nascentes localizadas no município de Torre de Pedra (SP) na região junto à Área de Preservação Ambiental (APA) da Cuesta Basáltica de Botucatu abrangendo uma sub-bacia de drenagem equivalente a 584,0 Km<sup>2</sup> no sentido do eixo Sul-Norte. Segundo Caramaschi (1986), trata-se de um rio que apresenta um forte gradiente latitudinal com um desnível que inicia ao 700 m de altitude chegando à 430 m na sua desembocadura com a represa de Barra Bonita, no município de Anhembi (SP). As características fisiográficas e paisagísticas mudam neste gradiente altitudinal, com trechos de vegetação primária nas encostas da Cuesta e fragmentos de mata de galeria entremeadas por pastagens e pequenos roçados. Na região mais próxima à represa, existem vários ecossistemas que fazem interface com o rio principal. Além de fragmentos de mata de galeria, há várias lagoas marginais que apresentam mosaicos de macrófitas aquáticas que estão conectadas com o rio, sob o regime hidrológico natural e antrópico (operação da UHE de Barra Bonita). Também, em grande extensão do seu entorno, pode-se observar crescente ocupação humana (chácaras de lazer e ranchos de pescadores esportivos e artesanais), atividades agrícolas intensas (particularmente cana-de-açúcar) e atividades de pecuária bovina (Novaes, 2008).

No Brasil existem somente dois trabalhos que registram *Henneguya* e *Myxobolus* no sistema nervoso de seus hospedeiros: Kent e Hoffman (1984) descreveram as espécies, *M. inaequus* e *H. theca* parasitando o cérebro de *Eigmannia virescens* e Azevedo *et al.* (2011) descreveram a espécie *H. torpedo* parasitando o cérebro e a medula espinhal de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*.

O presente estudo teve como objetivo analisar a biodiversidade dos mixozoários parasitos das espécies de peixes dominantes no Rio do Peixe, através da caracterização morfológica, histológica e molecular de mixozoários presentes em tecido nervoso e cérebro de três espécies de peixes pertencentes à ordem Characiformes, *Prochilodus lineatus* (Figura 4), *Astyanax altiparanae* (Figura 5) e *Cyphocharax modestus* (Figura 6) coletadas no rio do Peixe.



**Figura 1.** Mapa da área de estudo, mostrando detalhes do rio e suas coordenadas geográficas.



**Figura 2.** Mapa do Brasil com destaque para o Estado de São Paulo e microbacia do rio do Peixe. Ao fundo, em A, vista panorâmica da área de estudo (indicador amarelo); e abaixo, em B, as estações de coleta no baixo rio em Anhembi (SP): 1. Foz, 2. Lagoa da Usina e 3. Calha do Baiano e, em C, porção do médio rio, em Conchas (SP): 4. Santa Gertrude. As setas indicam a direção do fluxo de água dos rios. Fonte: Google Earth



**Figura 3.** Foto do rio do Peixe, município de Anhembi, estado de São Paulo.



**Figura 4.** Espécime de *Prochilodus lineatus* coletado do rio do Peixe. Escala: 5cm.

Fonte: FishBase



**Figura 5.** Espécime de *Astyanax altiparanae* coletado do rio do Peixe. Escala: 2 cm.

Fonte: FishBase



**Figura 6.** Espécime de *Cyphocharax modestus* coletado do rio do Peixe. Escala: 3cm.

Fonte: FishBase

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 70 peixes foi analisado sendo 20 *P. lineatus*, 30 *A. altiparanae* e 20 *C. modestus*. Para a captura dos peixes foram efetuadas coletas utilizando-se redes de espera simples de diferentes malhas. As redes de espera foram agrupadas em lotes com cinco panos de redes da seguinte forma: para o ponto situado na calha ou canal principal do rio, local com maior profundidade, foram utilizados dois cordões de redes de espera, um de malhas pequenas e outro de malhas grandes, e foram instaladas na região litorânea e em ordem crescente de malha; na lagoa, cuja profundidade geralmente é menor, apenas um lote de redes pequenas foi usado. Intercaladas as coletas com redes de espera, outros aparatos de captura como redes de arrasto (de 200 m de comprimento) e peneiras foram também utilizados, com o intuito de completar a amostragem desejada.

Após a coleta, de cada espécime e a respectiva identificação específica, foram registradas as seguintes informações: data e ponto da amostragem, comprimento padrão

(cm) e peso total (g).

Pequenas porções do tecido nervoso que apresentaram ou não coloração diferenciadas e amostras de cistos, foram examinados à procura de mixozoários. A coleta e processamento dos parasitos foram realizadas de acordo com os procedimentos indicados por Eiras *et al.* (2000). As cabeças e as cartilagens da coluna vertebral dos referidos hospedeiros foram cortadas e colocadas em um banho de 40-50 °C por dois a três minutos de maneira que os tecidos se separem facilmente da cartilagem, que foram separadas à volta do crânio e região dos otólitos e colocadas em recipiente onde foi acrescentado um volume igual de formalina 10% e posteriormente foram macerados. O material resultante foi depositado em béquer até sua sedimentação. Posteriormente foi retirado do fundo do béquer, de 5-10 gotas do sedimento e com este sedimento, foram montadas lâminas que ficaram em repouso até secagem completa, posteriormente estas lâminas foram coradas durante o período de cinco minutos com uma solução aquosa de verde de malaquita e enxaguadas com água corrente e o excesso de corante foi retirado utilizando álcool em concentração crescente (70%, 95% e 100%) durante 30 segundos para cada concentração (Eiras *et al.*, 2006).

A análise morfométrica dos esporos frescos foi realizada, utilizando sistema de análise de imagens QWin Lite 3.1 acoplado a um microscópio Leica DMLS seguindo os métodos de mensuração específicos. As fotografias foram realizadas em um microscópio com o dispositivo para Contraste de Interferência Diferencial (DIC). Para a identificação e diagnóstico dos mixozoários foram utilizados os trabalhos específicos para as espécies encontradas neste estudo. Todo o material coletado das brânquias que apresentaram alguma característica suspeita, também foi analisado, pois é possível que exista uma correlação entre as espécies presentes nos vários locais de infecção dentro deste hospedeiro.

Os vários fragmentos de tecidos coletados por ocasião das necropsias foram identificados e fixados em solução de Karnovsky e conservados na solução por tempo indeterminado até o momento do processamento do material. Após a fixação, foi realizada a retirada do material do fixador e iniciada a desidratação em concentrações crescentes de álcool (três lavagens em 70°GL substituído a cada duas horas, em seguida, o material permaneceu em álcool 95°GL por 4h). Foi realizada a passagem do material para uma mistura de resina + álcool por 12 horas. Finalmente o material foi transferido para a resina de infiltração e, posteriormente, foi feita a inclusão do material com a resina. De

acordo com as necessidades, foram realizadas as colorações especiais de acordo com Michalany (1980).

Para a análise molecular, os plasmódios foram tomados a partir de tecido do hospedeiro e recolhidos para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. O DNA do *Myxobolus* foi extraído por meio da QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi então quantificado e qualificado através de Nano Drop espectrofotômetro com 1,0 µL da amostra e eletroforese em gel de agarose a 0,7% (1080 ng/µl). As amostras foram diluídas com TE e a concentração de trabalho foi de 100 ng/µl. O 18S rDNA foi amplificado com os primers universais ERIB1 e ERBIB10 (Barta, 2007). Reações Nested PCR foram realizadas usando o primer conjunto MX5–MX3 (Andree, 1999). As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2 mL de volume total de 25 µL, com 10 pmol de cada primer (25 µM), 2,5 µL de TaKaRa Taq<sup>®</sup> tampão Hot Start versão de PCR 10X, 5 mmol de dNTPs, 0.625U de TaKaRa Taq<sup>®</sup> Hot Start Taq polimerase, 13,75 µL de H<sub>2</sub>O e 2 µL a partir da amostra. A incubação foi realizada em um termociclador Eppendorf Mastercycler Personal, com a desnaturação inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguido por 30 ciclos com desnaturação a 95 °C durante 1 minuto, hibridação a 48 °C durante 1 minuto e extensão a 72 °C durante 2 minutos, e depois uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos. A eficiência de amplificação foi controlada por eletroforese da reação em gel de agarose a 1,5% preparada num tampão TBE 1X (0.09M Tris -Borato; 0.002 EDTA) e coradas com brometo de etídio (0.1µg/mL) em 100V durante 40 minutos. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 250 pb e depois fotografados num transiluminador UV. As bandas obtidas a partir dos produtos da reação foram cortadas a partir do gel de agarose e purificado por meio de illustra GFX<sup>™</sup> PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Após a purificação, a amostra de DNA foi quantificada através de Nano Drop (Eppendorf) de absorvância 260 nm (A<sub>260</sub>). As reações de sequenciação foram realizadas por meio de ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems), o qual contém os iniciadores nas direções à frente (5' -3') e reverso (3'-5'). As reações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL com o volume total de 10 µL, contendo 2,0 µL de kit de reação ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems), 0,5 µL de o iniciador direto (10 µM) e 2,0 µL da PCR obtida do produto. As mesmas reações foram repetidos usando o iniciador de sentido reverso (10 pM). A incubação foi realizada em um termociclador (PTC 200, MJ Research), com uma desnaturação inicial a 96 °C durante 5

minutos, seguido por 35 ciclos com desnaturação a 96 °C durante 30 segundos, hibridação a 58 °C durante 60 segundos e extensão a 60 °C durante 4 minutos. Os produtos obtidos através de sequenciação foram submetidos a precipitação. Oitenta µg de isopropanol 80% foram inicialmente adicionados aos microtubos contendo os produtos da reação. As amostras foram, então, centrifugadas a 16.100g durante 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Após a adição de 150 µg de etanol a 70%, foi realizada uma outra centrifugação, e o sobrenadante foi descartado. A eliminação do álcool superior foi feito no concentrador (Concentrador 5301 , Eppendorf). As amostras foram diluídas em 2,2 µL de azul dextrano com uma adição de 5° Dye (Applied Biosystems) em uma concentração de 1:8 para posterior aplicação de gel desnaturante de 5% de uréiapoliacrilamida (Long Ranger Singel Packs/BMA). O seqüenciamento foi feito em DNA Sequencer ABI Prism 377 (Applied Biosystems), com tensão fixa em 300V e intervalo de tempo para a coleta de sinais fluorescentes em 2.400 exames/hora. A corrida de eletroforese foi realizada em tampão TBE 1X (0.09 M Tris -Borato; 0.002 EDTA), durante 3 horas e 30 minutos a 200 W, a uma temperatura aproximada de 51 °C. Durante a eletroforese, a fluorescência detectada na área de scanner a laser foi recolhida e armazenada pelo software de Data Collection 2.6 (Applied Biosystems). As amostras foram analisadas três vezes e os dados foram depois analisados por software de sequenciação Analysys 3.4 (Applied Biosystems), através da transformação de intensidade da fluorescência em picos correspondentes aos nucleotídeos (cromatograma).

Um padrão de nucleotídeo-nucleotídeo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (blastn) foi procurado (Altschul, 1997). As sequências das espécies *Myxobolus* obtidos a partir de *P. lineatus* foram alinhadas com sequências obtidas no GenBank utilizando CLC Sequence Viewer (Aarhus, Dinamarca). Para avaliar a posição das espécies *Myxobolus* obtidos a partir de *P. lineatus* em relação ao outro *Myxobolus* spp., análises filogenéticas foram realizadas utilizando os métodos filogenéticos de probabilidade máxima (ML) utilizando MEGA 5.0 Software (Tamura, 2011) (Tempe, EUA). Árvore inicial para a busca heurística foi obtida através da aplicação do método de Neighbor-Joining a uma matriz de distâncias entre pares estimados usando a Maximum Composite Likelihood (MCL) abordagem. A análise Bootstrap (1000 repetições) foi utilizada para avaliar a robustez relativa dos ramos das árvores. As espécies *Ceratomyxa sparusaurati* foram utilizados como grupo externo nas análises filogenéticas

### 3. RESULTADOS

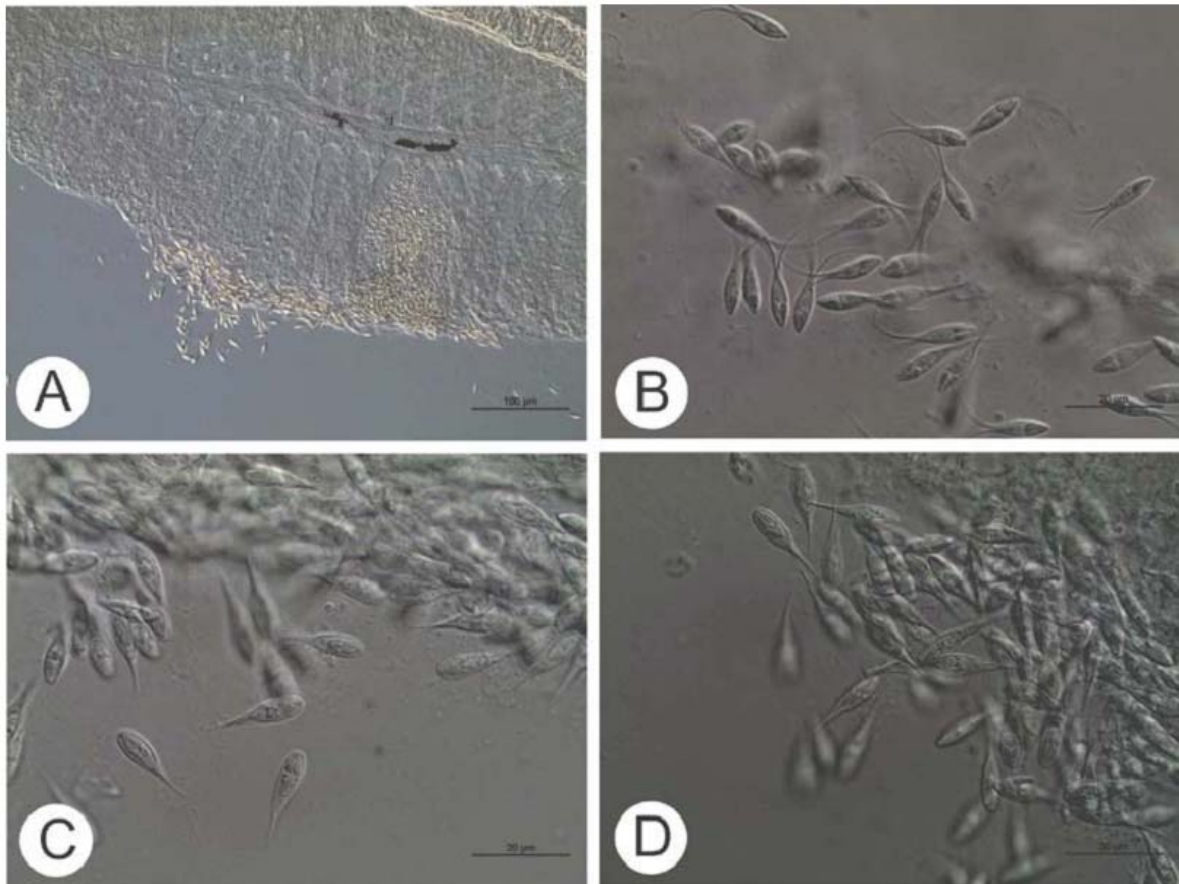
Dos 30 espécimes de *A. altiparanae* analisados, oito estavam parasitados por mixozoários pertencentes aos gêneros *Henneguya* e *Myxobolus*. Em seis espécimes de *Astyanax altiparanae* foram encontrados vários cistos de *Henneguya* sp. 1 (Figuras 7A e 7B) parasitando as brânquias deste peixe, em outro espécime foram encontrados esporos de *Henneguya* sp. 2 no sistema nervoso (Figura 8) e cistos desta mesma espécie nas brânquias (Figuras 7C e 7D) enquanto que outro espécime tinha sua medula parasitada por esporos de *Henneguya* sp. 2 e *Myxobolus* sp.

Dos 20 espécimes de *P. lineatus* necropsiados oito estavam parasitados por mixozoários pertencentes aos gêneros *Henneguya* e *Myxobolus*. Em somente um espécime foram encontrados esporos de *Henneguya* sp. 1 no sistema nervoso próximo à região dos otólitos. Nos outros sete espécimes foram encontrados vários cistos de *Henneguya* sp. 1, *Henneguya* sp. 2 e *Myxobolus* sp. nas brânquias deste hospedeiro (Figuras 9A-C).

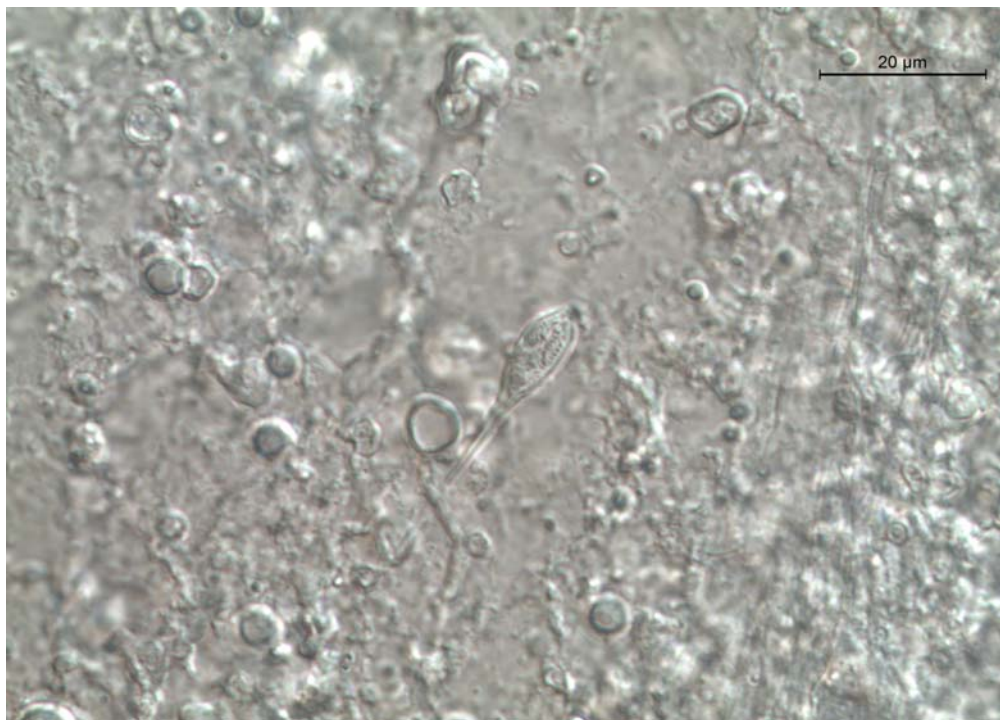
Em *C. modestus*, não foi encontrado nenhum cisto ou espora presente em tecido nervoso ou brânquias deste hospedeiro. A análise histológica das brânquias de *P. lineatus* (Figura 12) com *Myxobolus* sp. revelou numerosos cistos bem delimitados na base dos filamentos branquiais, na região da musculatura estriada próximos às artérias branquiais, porém nenhuma resposta inflamatória pronunciada foi encontrada no local de infecção. A análise de MET (Figuras 10-11) apresenta o detalhe ultraestrutural de uma seção longitudinal da cápsula polar (PC), mostrando diferentes seções do filamento polar (PF) com 10 voltas.

Na análise molecular o par de primers MX5-MX3 específico amplificou com sucesso um fragmento de aproximadamente 1.600 pb do gene 18S rDNA nos esporos obtidos de plasmódios encontrados infectando filamentos branquiais de *P. lineatus*. As amostras foram triplicadas e apresentaram 100% de similaridade, quando sequenciadas e alinhadas. Não corresponderam a busca, usando os dados da seqüência 18S rDNA parciais (1.527 pb) de *Myxobolus* sp. nov., qualquer um dos Myxozoa disponíveis no GenBank. Os dados da seqüência mostraram 73% de similaridade com *Myxobolus oliveirai* a espécie mais intimamente relacionada.

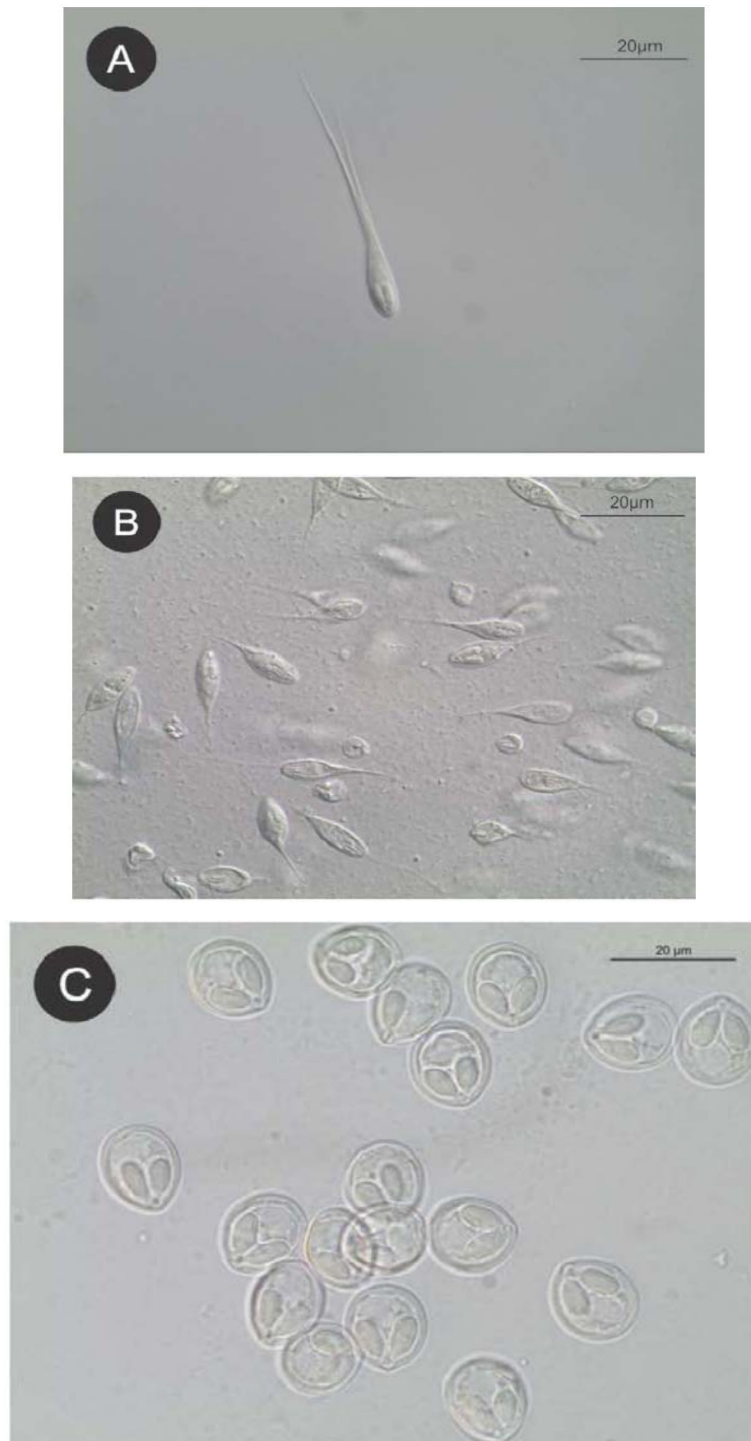
Nas análises filogenéticas (figura 13), as espécies de *Myxobolus* foram agrupadas em seis linhagens distintas. Estas espécies restantes foram agrupados em um grupo monofilético composto por numerosas espécies. *Myxobolus lomi* sp. nov. foi agrupado com outras dez espécies de *Myxobolus*, sendo apenas quatro destes parasitas de brânquias.



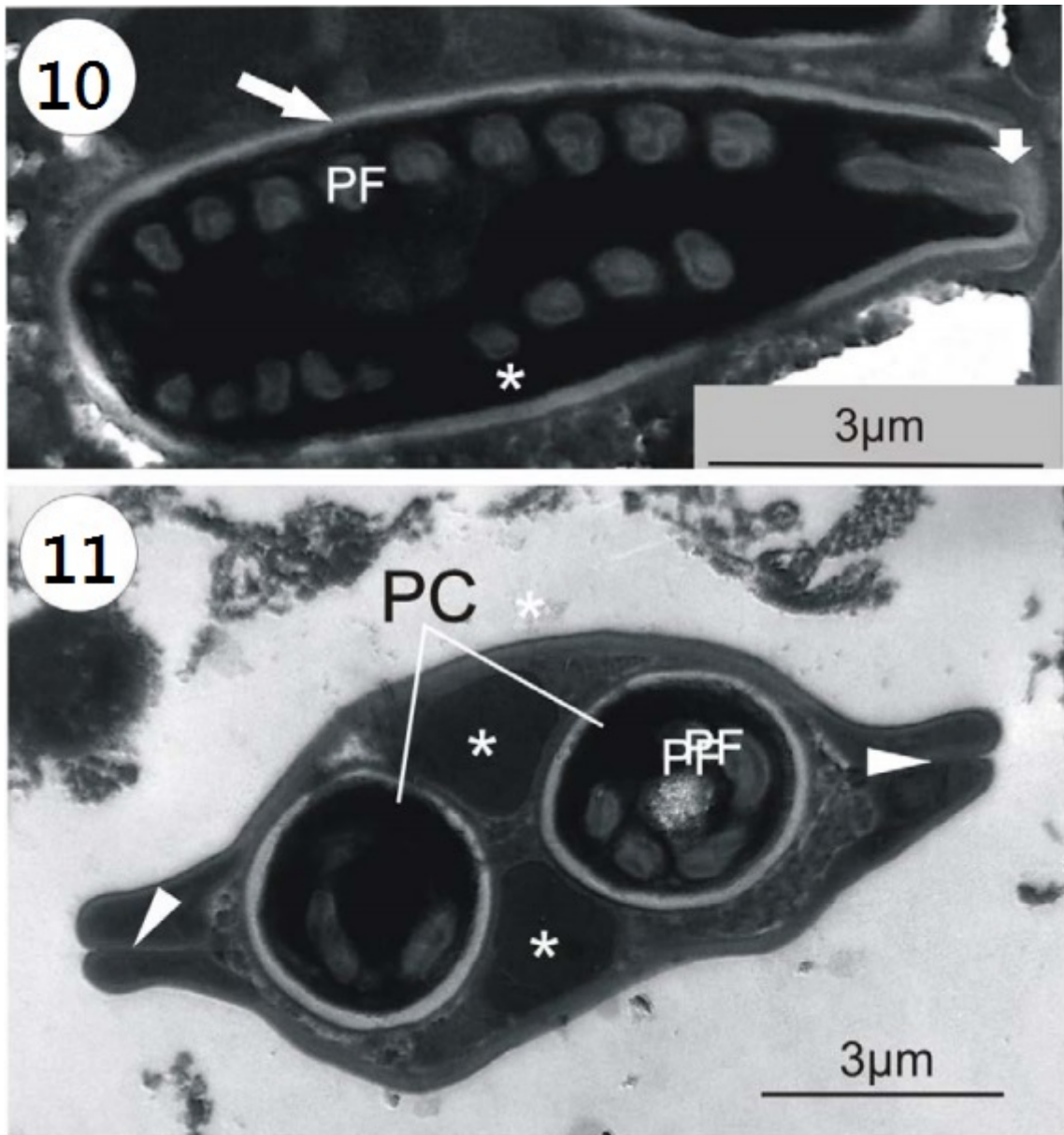
**Figura 7.** A Cisto de *Henneguya* sp. 1 nas brânquias de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 B. Esporos de *Henneguya* sp. 1; e C-D. Esporos de *Henneguya* sp. 2 encontrados nas brânquias de *Astyanax altiparanae* coletado no rio do Peixe.



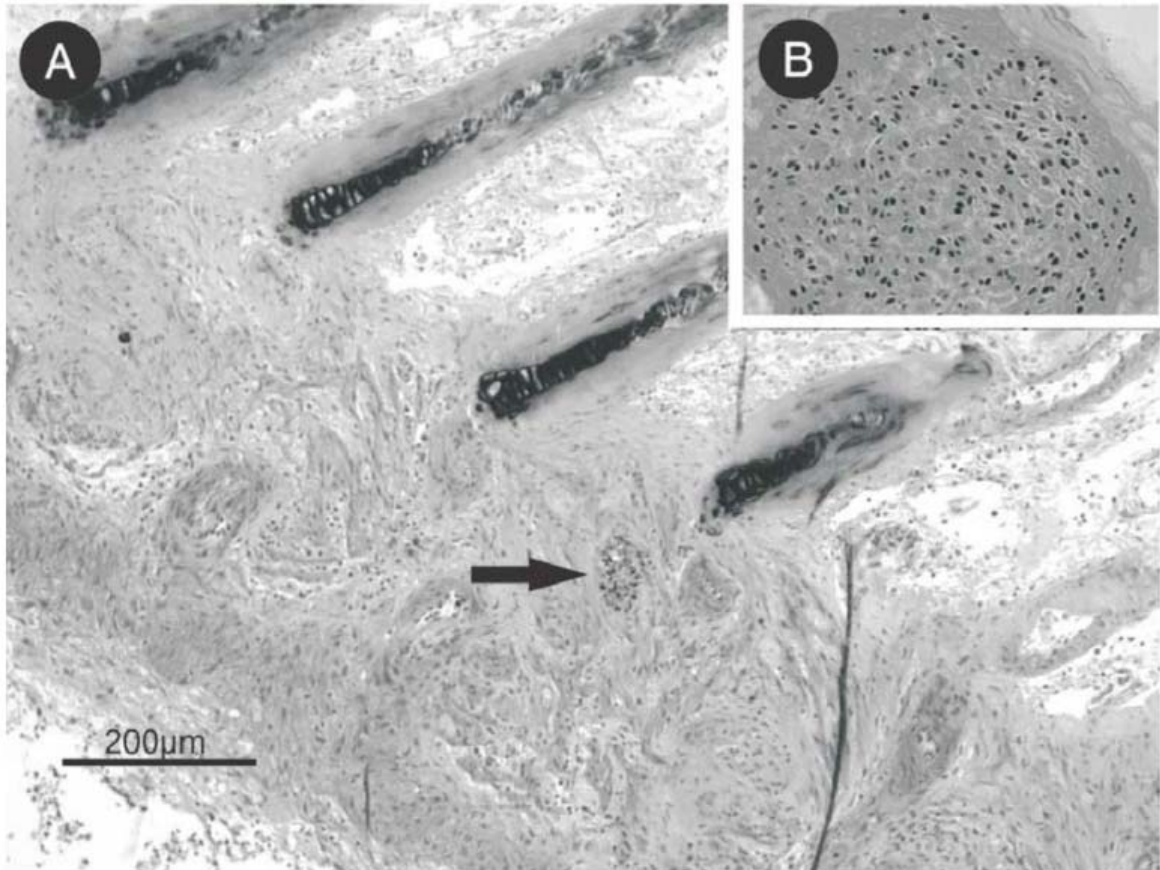
**Figura 8.** Esporos de *Henneguya* sp. 2 no sistema nervoso de *Astyanax altiparanae*.



**Figura 9.** **A.** Esporos de *Henneguya* sp.1; **B.** Esporos de *Henneguya* sp.2; **C.** Esporos de *Myxobolus* sp. Todos coletados parasitando as brânquias de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) coletados no rio do Peixe.



**Figura 10-11.** Microscopia Eletrônica de Transmissão do mixozoário *Myxobolus* sp. no peixe *Prochilodus lineatus*. 1. Detalhe ultraestrutural de uma seção longitudinal da cápsula polar (PC), mostrando diferentes seções do filamento polar (PF), parede da cápsula com uma única membrana (seta branca) e detalhe da região apical da cápsula polar (cabeça da seta); 2. Seção transversal da cápsula polar mostrando dois núcleos (\*) e duas cápsulas polares com filamento polar (PF) e linha de sutura da parede do esporo (cabeça da seta).



**Figura 12.** **A.** Corte histológico das brânquias de *Prochilodus lineatus* mostrando cisto (seta) na base do filamento branquial. **B.** Visão aumentada do cisto, mostrando o desenvolvimento síncrono (todos os esporos no mesmo estágio de desenvolvimento).



encontrados em peixes de pequeno tamanho, pode indicar que o parasitismo influencia no crescimento dos peixes, dificultando o mesmo.

Vem sendo demonstrado que a identificação de tais parasitas usando características morfológicas somente é muitas vezes insuficiente para finalizar um diagnóstico preciso. O emprego de métodos moleculares por meio de SSU rDNA - para além de marcadores morfológicos – permitem a discriminação de confiança entre as espécies, independentemente de seu estágio de vida (Iwanowicz, 2008).

Segundo Barassa et al. (2012) várias espécies de *Henneguya* induzem patogenia em seus hospedeiros. Porém a maioria das espécies induz pouca ou nenhuma resposta do hospedeiro e a condição mais comumente encontrada nas análises histológicas é o encapsulamento do plasmódio por tecido conectivo e fibrótico isolando o parasito e prevenindo sua dispersão para os tecidos adjacentes. As brânquias de *P. lineatus* infectadas por *Henneguya* sp. 2 não mostra nenhuma reação por parte do hospedeiro e o plasmódio está bem delimitado. Porém em grandes quantidades talvez este parasito possa comprometer a respiração deste hospedeiro, já que as trocas gasosas são realizadas nas brânquias dos peixes.

O fato de não serem encontradas respostas inflamatória pronunciadas no local da infecção por *Myxobolus* sp., é similar aos resultados encontrados por outros autores em espécies de mixozoários descritos no Brasil (Barassa et al. 2003, Eiras et al. 2008, 2009, Adriano et al. 2009a, b, Milanin et al. 2010). Porém, como os cistos foram encontrados muito próximo às artérias branquiais, talvez com o aumento dos cistos, uma possível compressão sanguínea possa ocorrer prejudicando a função branquial destes exemplares acometidos por *Myxobolus* sp.

Na maior parte das descrições de *Henneguya* sp. infectando brânquias em peixes da América do Sul a localização dos parasitas não é referido. Geralmente as indicações são de que as espécies ocorrem nas brânquias, especialmente nas descrições mais antigas, e apenas em alguns casos, a localização exata no órgão é dada precisamente. Ilustrações e histologia da infecção são raramente fornecidas. Portanto, os locais exatos de um número de espécies permanece incerto (Eiras, 2008). Este trabalho teve como objetivo descrever a presença de espécies de mixozoários no sistema nervoso de peixes, visto que no Brasil o assunto é muito pouco abordado, além de correlacionar com outros sítios de parasitismo do mesmo parasita.

A ausência de mixozoários em *C. modestus* pode ser explicada pela baixa quantidade amostral de hospedeiros ou pela época de coleta não ser propícia a presença de mixozoários nesse hospedeiro.

A presença de mixosporídeos pode causar grande perda econômica devido a alta mortalidade causada por eles em pisciculturas, e no meio silvestre pode causar grandes prejuízos ao hospedeiro pela possível perda de crescimento corporal e pela maior chance de ser predado devido as possíveis doenças presentes e menor tamanho.

Foram analisadas no trabalho uma nova espécie de mixozoário parasito de peixes, além de terem sido relatados os primeiros registros no Rio do Peixe e um novo sítio de infecção de mixozoários em *A. altiparanae*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIANO, E. A., ARANA, S., CARRIERO, M. M., NALDONI, J., CECCARELLI, P. S., & MAIA, A. A. M. 2009b. Light, electron microscopy and histopathology of *Myxobolus salminus* n. sp., a parasite of *Salminus brasiliensis* from the Brazilian Pantanal. **Veterinary Parasitology**, 165: 25–29.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res** 25:3389-402.
- ANDREE, K. B.; SZÉKELY, C.; MOLNÁR, K.; GRESOVIAC, S. J.; HEDRICK, R. P. 1999. Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bivalvidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences. **J Parasitol** 85:68-74.
- AZEVEDO, C.; CASAL, G.; MATOS, P.; ALVES, A.; MATOS, E. 2011. *Henneguya torpedo* sp. nov. (Myxozoa), a parasite from the nervous system of the Amazonian teleost *Brachyhyopomus pinnicaudatus* (Hypopomidae). **Disease of Aquatic Organisms** 93: 235–242.
- BARASSA, B.; ADRIANO, E. A.; ARANA, S.; CORDEIRO, N. S. 2003. *Henneguya curvata* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae) parasitizing the gills of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae: Serrasalmidae), a South American freshwater fish. **Folia Parasitologica** 50: 151-153.
- BARASSA, B.; ADRIANO, E.; CORDEIRO, N. S.; ARANA, S.; CECCARELLI, P. S. 2012. Morphology and host–parasite interaction of *Henneguya azevedoi* n. sp., parasite of gills

- of *Leporinus obtusidens* from Mogi-Guaçu River, Brazil. **Parasitology Research**, 110: 887-894.
- BARTA, J. R.; MARTIN, D. S.; LIBERATOR, P. A.; DASHKEVICZ, M.; ANDERSON, J. W.; FEIGNER, 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. **J Parasitol**, 83:262-71.
- CARAMASCHI, E. P. 1986. Distribuição da ictiofauna de riachos das Bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu, SP). Tese de Doutorado, UFSCar.
- EIRAS, J.C., 1994. *Elementos de ictioparasitologia*. Fundação Eng. António de Almeida, Portugal. 339p.
- EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. 2000. *Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes*. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 171p.
- EIRAS, J. C.; MOLNÁR, K.; LU, Y. S. 2005. Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). **Systematic Parasitology** 61: 1-46.
- EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. 2006. *Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes*. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 199p.
- EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. 2008. *Henneguya caudicula* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae) a parasite of *Leporinus lacustris* (Osteichthyes, Anostomidae) from the high Paraná River, Brazil, with a revision of *Henneguya* spp. infecting South American fish. **Acta Protozoologica** 47:149–154.
- 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** 159:154–158
- EIRAS, J. C.; MONTEIRO, C. M.; BRASIL-SATO, M.C. 2010. *Myxobolus franciscoi* sp. nov. (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae) a parasite of *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii: Prochilodontidae) from the Upper São Francisco River, Brazil, with a revision of *Myxobolus* spp. from South America. **Zoologia** 27: 131-137.

- IWANOWICZ, L. R., D. D. IWANOWICZ, L. M. POTE, V. S. BLAZER, AND W. B. SCHILL. 2008. Morphology and 18S rDNA of *Henneguya gurleyi* (Myxosporea) from *Ameiurus nebulosus* (Siluriformes) in North Carolina. **Journal of Parasitology** 94: 46–57.
- GRIFFIN, M. J.; POTE, L. M.; WISE, D. J.; GREENWAY, T. E.; MAUEL, M. J.; CAMUS, A. C. 2008. A novel *Henneguya* species from channel catfish described by morphological, histological, and molecular characterization. **Journal of Aquatic Animal Health** 20: 127-135.
- KENT, M. L.; HOFFMAN, G. L. 1984. Two new species of myxozoa, *Myxobolus inaequus* sp. n. and *Henneguya theca* sp. n. from the brain of a South American knife fish, *Eigemannia virescens* (V.). **Journal of Protozoology** 31: 91-94.
- MARTINS, M. L.; SOUZA, V. N.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; COSTA, A. J. 1999. Comparative evaluation of the susceptibility of cultivated fishes to the natural infection with myxosporean parasites and tissue changes in the host. **Revista Brasileira de Biologia** 59:263-269.
- MICHALANY, J. 1980. *Técnica Histológica em Anatomia Patológica*. Ed. Pedagógica e Universitária Ltda, São Paulo, 227p.
- MILANIN, T.; EIRAS, J. C.; ARANA, S.; MAIA, A. A. M.; ALVES, A. L.; SILVA, M. R. M.; CARRIERO, M. M.; CECCARELLI, P. S.; ADRIANO, E. A. 2010. Phylogeny, ultrastructure, histopathology and prevalence of *Myxobolus oliveirai* sp. nov., a parasite of *Brycon hilarii* (Characidae) in the Pantanal wetland, Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz** 105:762–769.
- NOVAES, J. L. C. 2008. Estudo comparativo da pesca artesanal em dois grandes reservatórios do Alto Paraná: Barra Bonita (Rio Tietê) e Jurumirim (Rio Paranapanema). Tese de Doutorado, UNESP.
- LUQUE, J. L. 2004. Biologia, Epidemiologia e Controle de parasitos de peixes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 13: 161-164.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol Biol Evol** 28:2731-39.
- VITA, P.; CORRAH, L.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. 2003. Ultrastructural aspects of the myxosporean *Henneguya astyanax* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae), a parasite of the

Amazonian teleost *Astyanax keithi* (Characidae). **Diseases of Aquatic Organisms** 53: 55-60.