



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E RECURSOS
AQUÁTICOS TROPICAIS**

JHONATA EDUARD FARIAS DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE
MICROPARASITOS EM *Metynnis hypsauchen*, *Metynnis lippincotianus* E
Serrasalmus rhombeus (CHARACIFORME:SERRASALMIDAE), ORIUNDOS
DOS MUNICÍPIOS DE SANTA IZABEL E IPIXUNA DO PARÁ, PARÁ,
BRASIL**

**BELÉM
2022**

JHONATA EDUARD FARIAS DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE
MICROPARASITOS EM *Metynnis hypsauchen*, *Metynnis lippincotianus* E
Serrasalmus rhombeus (CHARACIFORME:SERRASALMIDAE), ORIUNDOS
DOS MUNICÍPIOS DE SANTA IZABEL E IPIXUNA DO PARÁ, PARÁ,
BRASIL**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do programa de Pós-graduação em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito para a obtenção do Título de Mestre.

Área de Concentração: Ecologia Aquática.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Rodrigues Matos
Coorientador(a): Prof. Dra. Michele Velasco Oliveira da Silva

**BELÉM
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O48c Oliveira, Jhonata Eduard Farias de
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE MICROPARASITOS EM
Metynnis hypsauchen, Metynnis lippincotianus E Serrasalmus rhombeus
(CHARACIFORME:SERRASALMIDAE), ORIUNDOS DOS MUNICÍPIOS DE SANTA IZABEL E
IPIXUNA DO PARÁ, PARÁ, BRASIL / Jhonata Eduard Farias de Oliveira. - 2022.
99 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Aquicultura e Recursos Aquáticos
Tropicais (PPGARAT), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia,
Belém, 2022.
Orientador: Prof. Dr. Edilson Rodrigues Matos
Coorientador: Profa. Dra. Michele Velasco Oliveira da Silva.
-

1. Amazônia. 2. Serrasalmídeos. 3. Morfologia. 4. Myxozoa. 5. Calyptospora. I. Matos, Edilson Rodrigues, *orient.* II. Título

CDD


JHONATA EDUARD FARIAS DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE
MICROPARASITOS EM *Metynnis hypsauchen*, *Metynnis lippincotianus* E *Serrasalmus
rhombeus* (CHARACIFORME:SERRASALMIDAE), ORIUNDOS DOS MUNICÍPIOS
DE SANTA IZABEL E IPIXUNA DO PARÁ, PARÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais, para a obtenção do título de Mestre: Área de Concentração Aquicultura e Ecologia Aquática e Manejo de Recursos Naturais.

14.02.2022

Banca Examinadora:



Orientador

Prof. Dr. Edilson Rodrigues Matos
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



1º Examinador

Prof. Dra. Marcela Nunes Videira
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAPÁ - UEAP



2º Examinador

Prof. Dr. Diehgo Tuloza da Silva
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



3º Examinador

Prof. Dr. José Ledamir Sindeaux Neto
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA

AGRADECIMENTOS

A Deus de quem provém toda a biodiversidade, sendo o meu guia nessa árdua missão que é viver nesse planeta;

Aos meus familiares em especial a minha mãe Jucelina Farias;

A minha namorada, Chirle Caroline por todo apoio e carinho durante o desenvolvimento desse trabalho, aceitando todos os desafios da coleta;

Ao meu orientador prof. Dr. Edilson Matos, um dos pioneiros em estudos com microparasitos na Amazônia, foi de grande valia cada momento vivenciado no LPCA, onde pude aprender sempre, seja ensinamentos acadêmicos ou para a vida;

A minha coorientadora profa. Dra. Michele Velasco, uma das responsáveis pela minha iniciação e crescimento no meio científico, nunca mediu esforços para me ajudar;

As amizades construídas no LPCA em especial a Márcia Sacco e a Patrícia Sacco, pessoas que levarei para sempre no coração;

Aos amigos Dr. Sindeaux-Neto, Dr. Diehgo Tuloza, José Pompeu, Roger Leomar, Thallyta, Ellen Anjos e Glinda Fôro, por cada contribuição e momentos vividos;

Ao prof. Dr. Evonnildo Gonçalves, por propiciar o aprendizado de BM no laboratório de biotecnologia molecular da UFPA.

Ao prof. Dr. Igor Hamoy que disponibilizou o Laboratório de Genética Aplicada da UFRA, para as análises de BM.

Ao Sávio Guerreiro, por compartilhar o seu conhecimento e ser prestativo nos ensinamentos da BM.

Ao pescador “neném”, que me ajudou na coleta dos exemplares no rio Caraparu;

A Rayline Thaimenne pela amizade e o auxílio nas coletas no rio Capim;

Ao PPG AqRAT em especial ao secretário Alexandre e corpo docente;

Ao taxonomista Dr. Douglas Aviz, que identificou as espécies hospedeiras;

As agências de fomento CAPES e CNPQ, por disponibilizar as bolsas de estudos para o desenvolvimento dessa dissertação.

RESUMO

Os peixes são os hospedeiros mais parasitados do mundo, aspecto potencializado pelo hábito de vida aquática que é ideal para a propagação de diversas espécies de parasitos. Diante da riqueza ictiológica amazônica, estudos parasitológicos são fundamentais para caracterização dos táxons que acometem esses hospedeiros. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi descrever aspectos morfológicos de microparasitos oriundos de *Metynnis hypsauchen*, *Metynnis lippincotianus* e *Serrasalmus rhombeus*, capturados no rio Caraparu município de Santa Izabel do Pará e no rio Capim município de Ipixuna do Pará. Os exemplares foram transportados vivos para o Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) campus Belém, onde foram anestesiados, sacrificados e necropsiados. Buscas parasitológicas ocorreram com o auxílio de um estereomicroscópio, para observação de cistos e/ou tecido com indícios de parasitismo, confirmado por meio de lâminas com preparação a fresco visualizadas em microscópio óptico. As amostras foram fixadas e processadas para histologia e microscopia eletrônica de varredura. Nas análises morfológicas, foram observados mixosporos maduros de parasitos da classe Myxozoa, com morfologia inerente ao gênero *Myxobolus* no rim de *M. hypsauchen* e em vários órgãos de *M. lippincotianus*. Nessa última espécie hospedeira, também foram observados parasitos do gênero *Henneguya* nas brânquias, formando cistos intralamelares. Em *S. rhombeus* oocistos esféricos do coccídeo *Calyptospora* encontravam-se no parênquima hepático. A maior prevalência parasitária em ambos os locais de coleta, corresponderam ao período seco da Amazônia, sendo contínua até os meses transicionais. Estudos como esse são importantes para o conhecimento dos parasitos que acometem os serrasalmídeos, nos quais apresentaram mixozoários com morfotipos distintos dos descritos em peixes da região amazônica.

Palavras-chaves: Amazônia. Serrasalmídeos. Mixozoários. Coccídeos.

ABSTRACT

Fish are the hosts most parasitized in the world, an aspect enhanced by the aquatic life habit which is ideal for the propagation of several species of parasites. Given the richness of Amazonian fish, parasitological studies are essential to characterize the degree of pathogenicity in the host. In this context, the goal of this work was to describe morphological aspects of microparasites from *Metynnis hypsauchen*, *Metynnis lippincotianus* and *Serrasalmus rhombeus*, captured in the Caraparu river, located in Santa Izabel do Pará and Capim river, located in Ipixuna do Pará. The samples were transported alive to the Carlos Azevedo Research Laboratory of the Federal Rural University of Amazon (UFRA) campus Belém, where they were anesthetized, sacrificed and necropsied. Parasitological searches were supported by a stereomicroscope, for observation of cysts and/or tissue with evidence of parasitism, confirmed by freshly prepared slides viewed under an optical microscope. The samples were fixed and processed for histology and scanning electron microscopy. In the morphological analysis, mature spores of parasites of the Myxozoa class were observed, with morphology inherent to the genus *Myxobolus* in the kidneys of *M. hypsauchen* and in several organs of *M. lippincotianus*. In this last host species, parasites of the genus *Henneguya* were also observed in the gills, forming intralamellars cysts. In *S. rhombeus*, spherical oocysts of the *Calyptospora* coccidia were found in the hepatic parenchyma. The highest parasite prevalence in both collection sites corresponded to the dry period in the Amazon, being continuous until the transitional months. Studies like this one are important for the knowledge of the parasites that affect fish the serrasalmids, in which present myxozoans with morphotypes different from those described in fish from the Amazon region.

Keywords: Amazon. Serrasalmids. Myxozoans. Coccids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Exemplar de <i>M. hypsauchen</i> (Vista lateral) capturado no rio Capim em Ipixuna do Pará. ..	18
Figura 2- Exemplar de <i>M. lippincottianus</i> (Vista lateral) capturado no rio Caraparu em Santa Izabel do Pará.	19
Figura 3- Exemplar de <i>S. rhombeus</i> (Vista lateral) capturado no rio Capim em Ipixuna do Pará.	20
Figura 4- Diversidade filogenética e morfológica dos principais grupos de mixozoários, indicando o tipo de ambiente, famílias e o local preferencial de infecção. A largura das pontas dos ramos concerne a riqueza de espécies para cada grupo.	23
Figura 5 - Esquema do ciclo de vida dos mixozoários. A – Abertura das valvas e a extrusão dos filamentos polares para a ancoragem no epitélio intestinal. B- Gametogonia. C- Esporogonia da fase actinosporea. D- Actinosporo maduro, após o desenvolvimento dentro de um pansporocisto. E- Ancoragem do actinosporo nas brânquias ou na pele, após a liberação dos filamentos polares, facilitando a fixação. F - Multiplicação pré-esporogônica. G- Esporogonia da fase myxosporea.	24
Figura 6 - Fase esporogênica no hospedeiro intermediário. 1 – Célula pericítica (a) englobando uma célula germinativa (b). 2 – Célula germinativa envolvida pelo pericíclico. 3 – 4 Início do processo de divisão celular, por cariocinese e citocinese. 5 – No fim da divisão o esporo apresenta 2 células valvogênicas (CV), 2 células capsulogênicas (CC) e uma célula binucleada – o esporoplasma (CE). 6 – O esporo maduro possui capsulas polares (CP), esporoplasma (E) e valvas (V).	25
Figura 7- Desenho esquemático de <i>Myxobolus</i> sp.	26
Figura 8 – Desenho esquemático de <i>Henneguya rhamdia</i>	27
Figura 9 - Desenho esquemático de <i>C. paranaidji</i> . A - Oocisto, com destaque o véu membranoso (VM) recobrendo os esporocistos e os esporozoítos na região interna; B- Morfologia externa do esporocisto, ressaltando a sutura (SUT) e os esporopódios (SP).	29
Figura 10 - Fase esporogônica do ciclo de vida de <i>C. spinosa</i> ; 1- zigoto, com destaque ao vacúolo parasitóforo (*) e a célula hospedeira (HC); 2- Formação do esporoblasto; 3- Esporoblasto maduro; 4- Esporoblasto maduro é envolvido pelo véu do esporocisto.	30
Figura 11 – Rio Capim em Ipixuna do Pará.	31
Figura 12 - Mapa de localização da coleta dos espécimes no município de Ipixuna do Pará.	31
Figura 13- Rio Caraparu em Santa Izabel do Pará.	32
Figura 14 - Mapa de localização do ponto de coleta dos espécimes no município de Santa Izabel do Pará.	32
Figura 15 – Fotomicrografias de <i>Myxobolus</i> sp. nos rins de <i>M. hypsauchen</i> . A- Cistos (ponta da seta). B- Indicação de mixosporos maduros. C- Detalhes da estrutura dos mixosporos, com a proeminências das cápsulas polares (PC).	37

Figura 16 - Fotomicrografias em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de <i>Myxobolus</i> sp. nos rins de <i>M. hypsauchen</i> . A e B Indicação de mixosporos (Ponta da seta) próximo a eritrócitos (Er). C – Destaque para a linha de sutura (S) lateral do esporo.	37
Figura 17 – Análise de Componentes Principais (ACP) dos dados morfométricos de <i>Myxobolus</i> spp. CE: Comprimento do Mixosporo. LE: Largura do Mixosporo. CCP: Comprimento das Cápsulas Polares. LCP: Largura das Cápsulas Polares.....	38
Figura 18 – Fotomicrografia histológicas do rim de <i>M. hypsauchen</i> . A, B e C - Cistos de mixosporos maduros (C) causando compressão e deformação no epitélio cubóide do túbulo renal proximal (PCT). Presença do infiltrado mononuclear inflamatório (I) ao redor do túbulo infectado e a área de necrose multifocal (seta) e melanomacrófagos (MM) em HE. D e E - Cistos no epitélio cubóide dos túbulos renal proximal (PCT), causando deformação e deslocamento do lúmen (*) para o lado do túbulo. Observação de mixosporos livres no parênquima renal (S). F- Detalhe das cápsulas polares (CP) no esporo.	41
Figura 19 - Fotomicrografias em ML de <i>Calyptospora</i> sp. infectando o fígado de <i>S. rhombeus</i> . A- Aglomerados de oocistos. B- A ponta da seta indica esporocistos dentro dos oocistos. C- Destaque da estrutura do esporocisto, com esporozoítos (SZ) e véu membranoso (ponta de seta).	42
Figura 20 - Fotomicrografias em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de <i>Calyptospora</i> sp. no fígado de <i>S. rhombeus</i> . A- Oocistos (OC) compostos por 4 esporocistos (seta). B-D- Esporocisto (SP), com ênfase na sutura (S) e esporópodes (SPP).	42
Figura 21 - Análise de Componentes Principais (ACP) dos dados morfométricos de <i>Calyptospora</i> spp. DO- Diâmetro do Oocisto; CE- Comprimento do Esporocisto; LE- Largura do Esporocisto; O:E – Relação comprimento por largura do oocisto para o esporocisto.....	43
Figura 22 - Fotomicrografia histológica da infecção de <i>Calyptospora</i> sp. no fígado de <i>Serrasalmus rhombeus</i> . A, C e E- Oocistos disseminados no tecido hepático próximo aos vasos sanguíneos (*), com presença de fibroblastos (ponta de seta) e infiltrado de células mononucleares (I). B e F Indicam melanomacrófagos (MM) em torno dos oocistos. D revela necrose generalizada, degeneração hepática (ponta de seta) e a presença de glóbulos vermelhos (*) em tecido corado com ZN.....	45
Figura 23 - Fotomicrografias em DIC de <i>Henneguya</i> sp. infectando as brânquias de <i>M. lippincottianus</i> . A- Cisto localizado na brânquia. B- Mixosporo de <i>Henneguya</i> sp. (ponta da seta). C- Destaque para detalhes morfológicos dos mixosporo, como as Cápsulas Polares (CP) e as projeções caudais (PC). D- Desenho esquemático de <i>Henneguya</i> sp.....	46
Figura 24 - Análise de Componentes Principais (ACP) dos dados morfométricos de <i>Henneguya</i> spp. TT – Tamanho Total. CE - Comprimento do Corpo do Esporo. LE – Largura do Corpo do Esporo. CC- Comprimento Caudal. CCP – Comprimento das Cápsulas Polares. LCP – Largura das Cápsulas Polares.	47
Figura 25 - Microfotografias histológicas de <i>Henneguya</i> sp. nas brânquias de <i>M. lippincottianus</i> . A- Seta indicando cisto intralamelar. corado em HE. B- Mixosporos destacados em coloração de ZN. ...	49

Figura 26 - Fotomicrografias em DIC de *Myxobolus* sp. infectando *M. lippincottianus*. A- Mixosporos de *Myxobolus* sp. B- Presença de esporo maduro envolvido por um plasmódio (*). C- Indicação de dois morfotipos de mixosporos, um piriforme (seta maior) e outro elíptico (seta menor); D e E Desenhos esquemáticos de ambos morfotipos, com destaque para estruturas internas, como as cápsulas polares (CP) e o esporoplasma (SP).....51

Figura 27 - ACP dos dados morfométricos de *Myxobolus* spp. descritos na Amazônia brasileira. CE: Comprimento do Esporo. LE: Largura do Esporo. CCP: Comprimento das Cápsulas Polares. LCP: Largura das Cápsulas Polares.52

Figura 28 - Fotomicrografias de *Myxobolus* sp. infectando *M. lippincottianus* coradas em ZN. A – Esporo maduro no baço. B- Mixosporos nos intercisio renal, próximo a melanomacrofágos (MM). C- Destaque para a estrutural do esporo, com as cápsulas polares (CP) e esporoplasma (SP).....54

Figura 29 - Quantitativo de espécimes infectados por trimestres (Tri) anuais.55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados parasitológicos por hospedeiro.....	35
Tabela 2 - Dados morfométricos (μm) de <i>Myxobolus</i> spp. descritos no Brasil. NVFP - Número de voltas do filamento polar.	39
Tabela 3 - Dados morfométricos (μm) de <i>Calyptospora</i> spp. Diâmetro do Oocisto (OD). Relação comprimento por largura do oocisto para o esporocisto (O:E).....	44
Tabela 4 - Dados morfométricos (μm) de <i>Henneguya</i> spp. em hospedeiros da Amazônia. TT: Tamanho total. CC: Comprimento da cauda. NVFP: Número de voltas do filamento polar. ..	48
Tabela 5 - Dados morfométricos (μm) de <i>Myxobolus</i> spp. em hospedeiros da Amazônia. NVFP - Número de voltas do filamento polar.	53

LISTA DE ABREVIATURAS

BM – Biologia Molecular

CEUA- Comissão de Ética de Uso de Animais

DIC- Contraste de Interferência Diferencial

HE – Hematoxilina e Eosina

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

LGA - Laboratório de Genética Aplicada

LPCA – Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

ACP – Análise de Componentes Principais

UFPA- Universidade Federal do Pará

UFRA- Universidade Federal Rural da Amazônia

ZN – Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Considerações Gerais	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Família Serrasalmidae	16
3.1.1 <i>Metynnis hypsauchen</i> (Müller & Troschel, 1844).....	17
3.1.2 <i>Metynnis lippincottianus</i> (Cope, 1870).....	18
3.1.3 <i>Serrasalmus rhombeus</i> (Linnaeus, 1766).....	19
3.2 Relação parasita-hospedeiro em peixes	20
3.3 Filo Cnidária – Classe Myxozoa	21
3.3.1 Gênero <i>Myxobolus</i> Bütschli 1882.....	26
3.3.2 Gênero <i>Henneguya</i> Bütschli 1882.....	27
3.4 Filo Apicomplexa – Subclasse Coccidia	28
3.4.1 Gênero <i>Calyptospora</i> Overstreet, Hawkins e Fournie 1984.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Coleta dos espécimes e transporte	30
4.2 Eutanásia, necropsia e coleta das amostras	33
4.3 Histologia	33
4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	34
4.5 Morfometria e estatística	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 <i>Myxobolus</i> no rim de <i>Metynnis hypsauchen</i>	36
5.2 <i>Calyptospora</i> no fígado de <i>S. rhombeus</i>	41
5.3 <i>Henneguya</i> nas brânquias de <i>M. lippincottianus</i>	46
5.4 <i>Myxobolus</i> em órgãos de <i>M. lippincottianus</i>	50
5.5 Influência da sazonalidade na carga parasitária	55

6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO	73
APÊNDICE	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

O peixe é um dos alimentos mais consumidos no mundo, com elevada demanda principalmente nos países mais pobres da Ásia, África e América do Sul (TIDWELL; ALLAN, 2001; BRABO *et al.*, 2016). E dentre os fatores que justificam esse elevado consumo, consideramos o valor nutricional, fonte de ácidos graxos ômega-3, vitaminas, minerais e oligoelementos (SARTORI; AMANCIO, 2012; TACON; METIAN, 2013; KWASEK *et al.*, 2020).

Na América do Sul, o Brasil possui as condições geográficas favoráveis para a produção pesqueira, com extenso litoral e grande quantidade de águas intercontinentais (KIRCHNER *et al.*, 2016). E na região norte, o Pará é um dos estados que possui a maior rede hidrográfica, apresentando rios e zonas estuarinas, ricas em nutrientes, característico do bioma amazônico que é o detentor da maior diversidade de peixes do mundo, com 2.406 espécies (ISAAC *et al.*, 2011; JÉZÉQUEL *et al.*, 2020a).

Esses aspectos são favoráveis à comercialização do pescado, que no Estado é direcionada principalmente para o abastecimento do comércio local, feiras e mercados municipais e para a exportação, atendendo outros estados e países (CARVALHO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2020a). Diante dessa diversidade e importância econômica, estudos ictioparasitológicos possuem uma tendência de crescimento, seja no ambiente natural ou em sistemas de cultivo (AQUINO *et al.*, 2019). Isso ocorre devido o meio aquático apresentar aspectos físicos favoráveis para a disseminação, reprodução e complementação do ciclo de vida dos parasitos (MALTA, 1984; NEGRÃO *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2020).

Em um processo de coevolução os parasitos desenvolveram diversas adaptações morfológicas em resposta ao sistema imune do hospedeiro, assim como em relação as alterações ambientais (SURES *et al.*, 2017). De acordo com Thatcher (1981), os principais fatores ligados a patogenicidade são: a poluição industrial, decomposição da matéria orgânica (com a liberação de substâncias tóxicas no ambiente aquático) e as infecções por microrganismos. Diante disto, estudos dessa natureza são imprescindíveis para a realização de um levantamento acerca dos parasitos que acometem os peixes, assim como os efeitos provocados por esse tipo de relação no hospedeiro, principalmente na Amazônia que possui muitas espécies de interesse comercial (JÉZÉQUEL *et al.*, 2020b).

Entre os microparasitos que já foram descritos em peixes da Amazônia, encontram-se os cnidários da classe Myxozoa, que infectam os seus hospedeiros vertebrados, por meio de mixosporo, em diferentes sítios de infecção como coração, brânquias, musculatura e tecido ósseo (MATOS *et al.*, 2005; MATOS *et al.*, 2014; VELASCO *et al.*, 2015; SINDEAUX-NETO *et al.*, 2017). E os coccídeos, do gênero *Calyptospora*, que causam infecções hepáticas, geralmente visualizados em microscopia de luz na sua forma oocística (CASAL *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2012; NEGRÃO *et al.*, 2019).

Nesse contexto, estudos ictioparasitológicos em serrasalmídeos devem ser ressaltados, especialmente os pacus *Metynnis hypsauchen* (Müller & Troschel, 1844), *Metynnis lippincotianus* (Cope, 1878) e a piranha *Serrasalmus rhombeus* (Linnaeus, 1766), que podem ser encontrados em vários rios da bacia amazônica. Importantes no viés econômico e ecológico, pois são comercializados como peixes ornamentais em mercados abertos de países sul-americanos e são fundamentais na reprodução de plantas em áreas de várzeas e para o controle populacional no ecossistema aquático (FERREIRA *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar aspectos morfológicos e histopatológicos dos microparasitos em *Metynnis hypsauchen*, *Metynnis lippincotianus* e *Serrasalmus rhombeus*, capturados no rio Caraparu município de Santa Izabel do Pará e no rio Capim município de Ipixuna do Pará.

2.2 Específicos

- Analisar a prevalência parasitária em diferentes períodos do ano;
- Verificar a ocorrência de multiparasitismo.
- Realizar descrições morfológicas dos microparasitos;
- Avaliar a patogenicidade nos tecidos do hospedeiro por meio de técnicas histológicas de rotina e especial.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Família Serrasalmidae

A família serrasalmidade é representada pelos pacus e as piranhas, incluindo 69 espécies descritas em 16 gêneros, distribuídos nas bacias hidrográficas da América do sul tropical e subtropical, grande parte encontra-se ao leste do Andes e uma espécie na bacia de Maracaibo. Achados fósseis confirmam que essa distribuição era maior, alcançando mais ao oeste de Magdalena na Argentina (MACHADO *et al.*, 2018; KOLMANN *et al.*, 2020).

Filogeneticamente são distribuídos em três sub-clados em consonância com o tipo de alimentação, os dois primeiros são compostos por espécies de hábito herbívoro, o clado dos pacus (*Colossoma*, *Mylossoma* e *Piaractus*) e o clado *Myleus* (*Mylesinus*, *Myleus*, *Myloplus*, *Ossubtus*, *Tometes* e *Utiaritchthys*); e por último o clado dos carnívoros, representado pelas piranhas (*Pristobrycon*, *Pygocentrus*, *Pygopristis* e *Serrasalmus*), exceto os gêneros *Catoprion* e *Metynnis*, que são lepidofágicos e herbívoros, respectivamente (THOMPSON *et al.*, 2014).

As características morfológicas distintas dos integrantes da família é a presença de um corpo comprimido, com uma barbatana dorsal longa com mais de 16 raios e a presença de serras afiadas abdominais, que variam de 6 a 9 em *Acnodon* e mais de 60 em *Piaractus* (ORTÍ, 2008). A dentição das espécies carnívoras apresenta uma fileira de dentes triangulares e afiados, enquanto os herbívoros e onívoros possuem duas fileiras de grandes dentes incisiformes na mandíbula inferior e molariformes na mandíbula superior, especializados para cortar pedaços de plantas ou esmagar frutos e sementes duras. Inclusive há uma maior quantidade de ferro em substituição do cálcio nos dentes desses indivíduos, sendo possível observar uma pigmentação vermelha nas bordas dos dentes (SHELLIS; MILES, 1976; GOULDING, 1980; GOULDING; CARVALHO, 1982; DELAUNOIS *et al.*, 2020).

Em um processo evolutivo, as espécies desses grupos, principalmente os carnívoros possuem um aparelho sonoro complexo. Em um estudo conduzido por Mélotte *et al.* (2019) foi observado a dupla função dos músculos hipoxiais de espécies de hábito alimentar herbívoro para a locomoção e a produção de som, sendo que em algumas espécies mais derivadas como *Catoprion* e *Pygopristis*, esses músculos se diferenciaram de forma integral apresentando somente a função secundária na produção de som.

No contexto ecológico, os pacus são importantes como dispersores de sementes em florestas primárias de áreas inundadas, praticando assim a ictiocoria, na qual muitas espécies

vegetais são altamente dependentes desse tipo de dispersão para a sua reprodução, pois as sementes que são digeridas no trato intestinal desses animais possuem maior probabilidade de germinação. Essa prática é comum em espécies populares como os tambaquis (*Colossoma*) e a pirapitinga (*Piaractus*) que são atraídos devido ao som das frutas que caem na água (ANDERSON *et al.*, 2009; GOULDING, 1980).

3.1.1 *Metynnis hypsauchen* (Müller & Troschel, 1844).

Os espécimes de *Metynnis hypsauchen*, peixe popularmente conhecido como pacu, geralmente vivem em aglomerações, formando cardumes próximos as macrófitas aquáticas (CANAN; GURGEL, 2002). Possuem hábito alimentar diversificado incluindo sementes, flores, frutas e pequenos artrópodes (SANTOS *et al.*, 2009). As apomorfias morfológicas do grupo é a presença de 14-18 rastros branquiais no ramo superior e possui 19-25 séries de escamas entre a linha lateral e o início da nadadeira adiposa (Figura 1). O corpo é alto e comprimido, geralmente elíptico, sendo a porção mais alta onde se encontra as nadadeiras dorsal e pélvica (OTA, 2015). A sua classificação taxonômica é a seguinte (ITIS, 2021):

Reino Animalia

Filo Chordata

Classe Teleostei

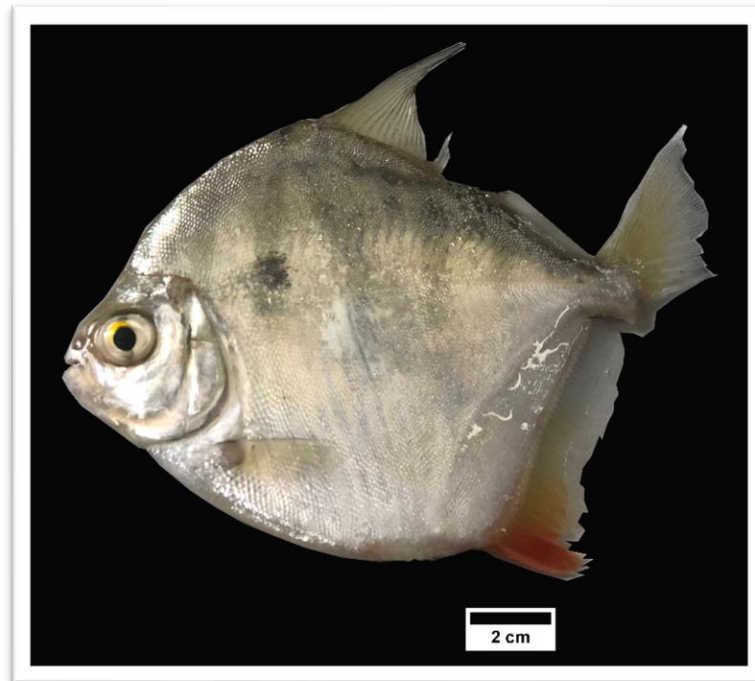
Ordem Characiforme

Família Serrasalmidae

Gênero *Metynnis* Cope, 1878

Espécie *M. hypsauchen* Müller & Troschel, 1844

Figura 1- Exemplar de *M. hypsauchen* (Vista lateral) capturado no rio Capim em Ipixuna do Pará.



Fonte: LPCA, 2021.

3.1.2 *Metynnis lippincottianus* (Cope, 1870).

A morfologia de *M. lippincottianus* se distingue das demais espécies do gênero por apresentar 8-12 rastros branquiais no ramo superior e 12-14 rastros no ramo inferior, também possui 65-90 escamas perfuradas na linha lateral e não apresenta espinhos bifurcados na região pré-pélvica (Figura 2). É comumente encontrado nas bacias da Guiana francesa e brasileira, sendo associado a ambientes lânticos e com banco de macrófitas aquáticas, obtendo uma alimentação baseada em pedaços de plantas, artrópodes e detritos (CARVALHO *et al.*, 2020; OTA, 2015).

Reino Animalia

Filo Chordata

Classe Teleostei

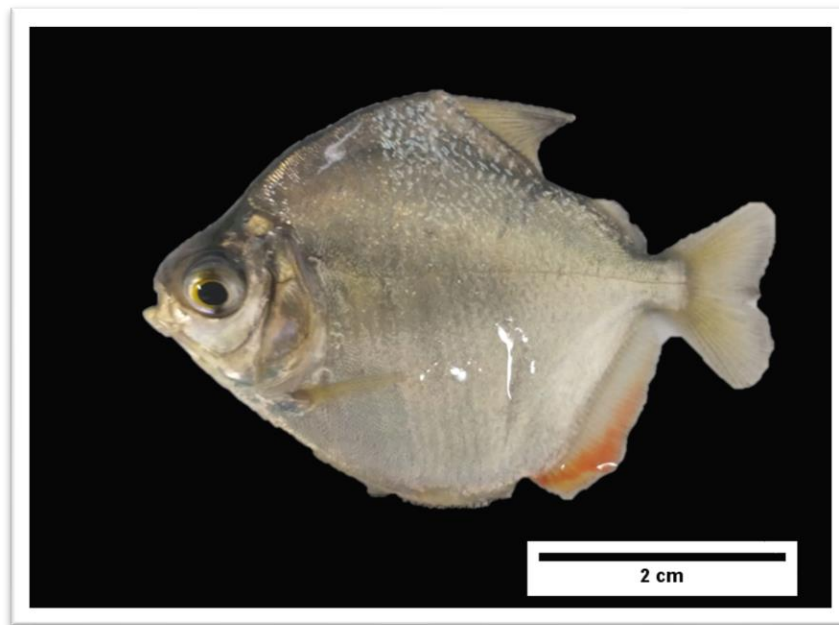
Ordem Characiformes

Família Serrasalminidae

Gênero *Metynnis* Cope, 1878

Espécie *M. lippincottianus* Cope, 1870

Figura 2- Exemplar de *M. lippincottianus* (Vista lateral) capturado no rio Caraparu em Santa Isabel do Pará.



Fonte: LPCA, 2021.

3.1.3 *Serrasalmus rhombeus* (Linnaeus, 1766).

A piranha negra, pode ser encontrada na bacia amazônica, Orinoco, no norte e leste da Guiana e rios costeiros do nordeste brasileiro (JÉGU, 2003). A alimentação ocorre a partir da ingestão de peixes, crustáceos e invertebrados aquáticos, sendo uma espécie fundamental para o equilíbrio da população aquática (SÁ-OLIVEIRA *et al.*, 2017; CARDOSO *et al.*, 2019; REIS *et al.*, 2020). Apresenta um corpo alto, com um porte grande até de 50 cm, nas fases juvenis possui machas escuras arredondadas no corpo e manchas escuras nas extremidades das nadadeiras caudal e anal, enquanto nos adultos essa região é continuamente cinza (Figura 3) (SANTOS *et al.*, 2009).

Reino Animalia

Filo Chordata

Classe Teleostei

Ordem Characiformes

Família Serrasalmidae

Gênero *Serrasalmus* Lacepède, 1803

Espécie *S. rhombeus* Linnaeus, 1766

Figura 3- Exemplar de *S. rhombeus* (Vista lateral) capturado no rio Capim em Ipixuna do Pará.



Fonte: LPCA, 2021.

3.2 Relação parasita-hospedeiro em peixes

A maior diversidade parasitária é encontrada nos peixes, pois esses hospedeiros apresentam um grande número de espécies, distribuição geográfica ampla, a maioria encontram-se em ambientes dulcícolas das zonas tropicais e subtropicais (15.200 espécies) ao invés do marinho (14.800 espécies), essa característica é proveniente principalmente da alta especiação induzida por fatores biogeográficos e adaptações a temperatura, que resultam em distribuições diferentes nos continentes, e o hábito aquático, é facilitador para a ocorrência de diferentes vias de transmissão dos parasitos (THATCHER, 2006; LEVÊQUE *et al.*, 2007; VEGA; WIENS, 2012; ALBOUY *et al.*, 2019).

A relação parasito-hospedeiro é uma das relações ecológicas mais promissoras no âmbito evolutivo, surgindo diversas vezes de forma independente nos mais variados filos, por meio de relações antagonistas que induzem adaptações exploratórias das características biológicas específicas do hospedeiro (TIMI; POULIN, 2020). Em decorrência de ser uma relação negativa, o parasitismo influencia no crescimento, comportamento e em casos excepcionais impossibilita a capacidade de repassar os genes para as próximas gerações, levando até mesmo a extinção de uma espécie (BARBER *et al.*, 2000). A extinção potencializada por ações antrópicas ou até mesmo na redução populacional de hospedeiros é

um problema, principalmente para os parasitos que são altamente especialistas (DALLAS; CORNELIUS, 2015; FARRELL *et al.*, 2015; BELLAY *et al.*, 2020).

Em aspectos gerais essa relação pode ser designada em duas vertentes, o grau de patogenicidade do parasito e a capacidade de defesa do hospedeiro, relacionado a imunoreposta e outras estratégias anatômicas e fisiológicas (RICKLEFS, 2011). Em períodos de maior estresse, ocorre uma alta capacidade de reprodução parasitária, em contrapartida, o hospedeiro apresenta diferentes níveis de tolerância ao patógeno e alterações reprodutivas, que variam de acordo com a espécie (GLEICHNER *et al.*, 2016).

A ictioparasitologia é a área de estudo que analisa as variadas formas de interações entre parasitos e peixes (MACHADO *et al.*, 1996). No ambiente natural, essas interações são dependentes diretamente de fatores abióticos e bióticos que atuam causando impactos ambientais, alterando os ciclos hidrológicos e as populações de parasitos, especificamente na prevalência e tamanho das infrapopulações, que são suscetíveis as mudanças fisiológicas do hospedeiro e a qualidade da água (SCHOLZ, 1999)

No cultivo a intensificação por causa do confinamento, adensamento com grande quantitativo de animais, parâmetros da qualidade da água inadequados, redução de oxigênio dissolvido, alterações nutricionais e na temperatura, predispõem o hospedeiro ao parasitismo, provocando a mortalidade, influência no crescimento, comportamento e reduz a comercialização, resultando em prejuízos econômicos consideráveis (PAVANELLI *et al.*, 2002; ZANOLO; YAMAMURA, 2006; TAVECHIO *et al.*, 2018).

A localização dos parasitos permite classificá-los quando situados na superfície do hospedeiro em contato com o meio externo, como ectoparasitos e endoparasitos quando estão dispostos internamente (BUSH *et al.*, 2001). Entre os endoparasitos causadores de doenças em peixes de todo o mundo destaca-se, o filo Cnidária, especialmente a classe Myxozoa, assim como os pertencentes ao filo Apicomplexa, ambos integrantes do reino Animalia e Protistas, respectivamente.

3.3 Filo Cnidária – Classe Myxozoa

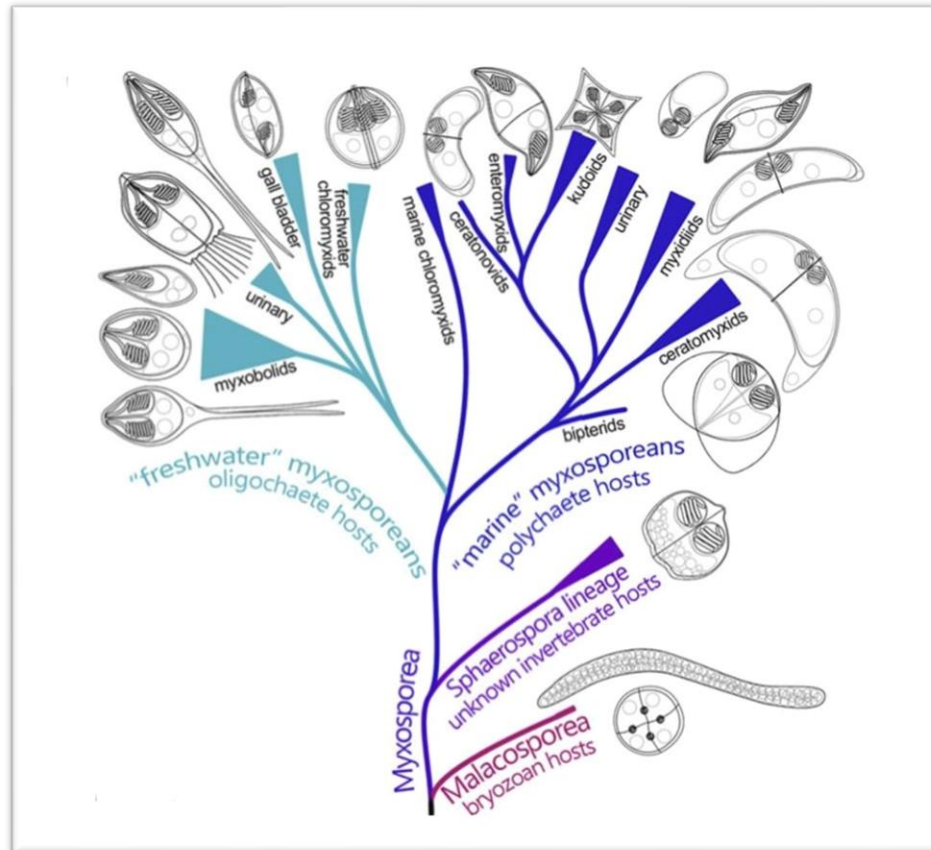
A Classe myxozoa são cnidários endoparasitos obrigatórios pertencentes ao Subfilo Endocnidozoa, formando um táxon irmão com Polyplodiozoa que possui apenas uma espécie *Polypodium hydriforme* (CHANG *et al.*, 2015; KOCH *et al.*, 2021). Anteriormente eram classificados como protistas, mas dados filogenéticos de marcadores moleculares da pequena

subunidade ribossômica 18S, demonstraram maiores similaridades filogenéticas com os cnidários (SMOTHERS, 1994; SIDDALL *et al.*, 1995; CHANG *et al.*, 2015; OKAMURA *et al.*, 2015). A simplificação é uma característica adaptativa dos mixozoários, com um genoma pequeno e a concatenação de estruturas morfológicas (FEIST; LONGSHAW, 2006; FOOX; SIDAL, 2015). Análises de transcriptoma e proteômica têm demonstrado a presença de transcritos homólogos a outros cnidários de vida livre, mas com uma redução significativa, associada ao tamanho do genoma e ao parasitismo (HARTIGAN *et al.*, 2021).

O parasitismo foi um fator determinante para o sucesso evolutivo, estimando-se em mais de 2.600 espécies descritas em uma variedade de hospedeiros como: anfíbios, aves, invertebrados oligoquetas e poliquetas, répteis e em peixes concentrando-se a maior diversidade (LOM *et al.*, 2006; BARTHOLOMEW *et al.*, 2008; KAWAI *et al.*, 2012; OKAMURA *et al.*, 2018; KLIMPEL *et al.*, 2019; ROCHA *et al.*, 2020). Os humanos são os únicos mamíferos com relatos de mixozoários, embora não seja caracterizada como uma infecção verdadeira, pois não ocorre o desenvolvimento e proliferação dos parasitos, mas sintomas gastrointestinais são associados (MCCLELLAND *et al.*, 1997; BOREHAM *et al.*, 1998; HALLET *et al.*, 2015). O estudo de Reis *et al.*, (2019) tem descrito mixosporos de mixozoários em fezes de pessoas assintomáticas em comunidades da Amazônia, após ingestão de pescado.

Os Myxozoos são classificados em duas subclasses de acordo com as características morfológicas e ciclo de vida. Malacosporea compreende ao grupo que infecta briozoários de água doce, e a subclasse Myxosporea, inclui os peixes e os anelídeos, apresentando duas ordens, a Bivalvulida Schulman, 1959, considerada a mais diversa, nas quais os Mixosporos possuem duas valvas, variando de um a quatro cápsulas polares e a Multivalvulida Schulman, 1959, comportando as espécies que possuem três a sete valvas e duas a sete cápsulas polares, enquanto a classe Malacosporea possui apenas a ordem Malacovalvulida, composta por espécies do gênero *Tetracapsula* e *Buddenbrockia* (Figura 4) (CANNING *et al.*, 2004; TOPS *et al.*, 2005; JUNIOR, 2014; ATKINSON *et al.*, 2018).

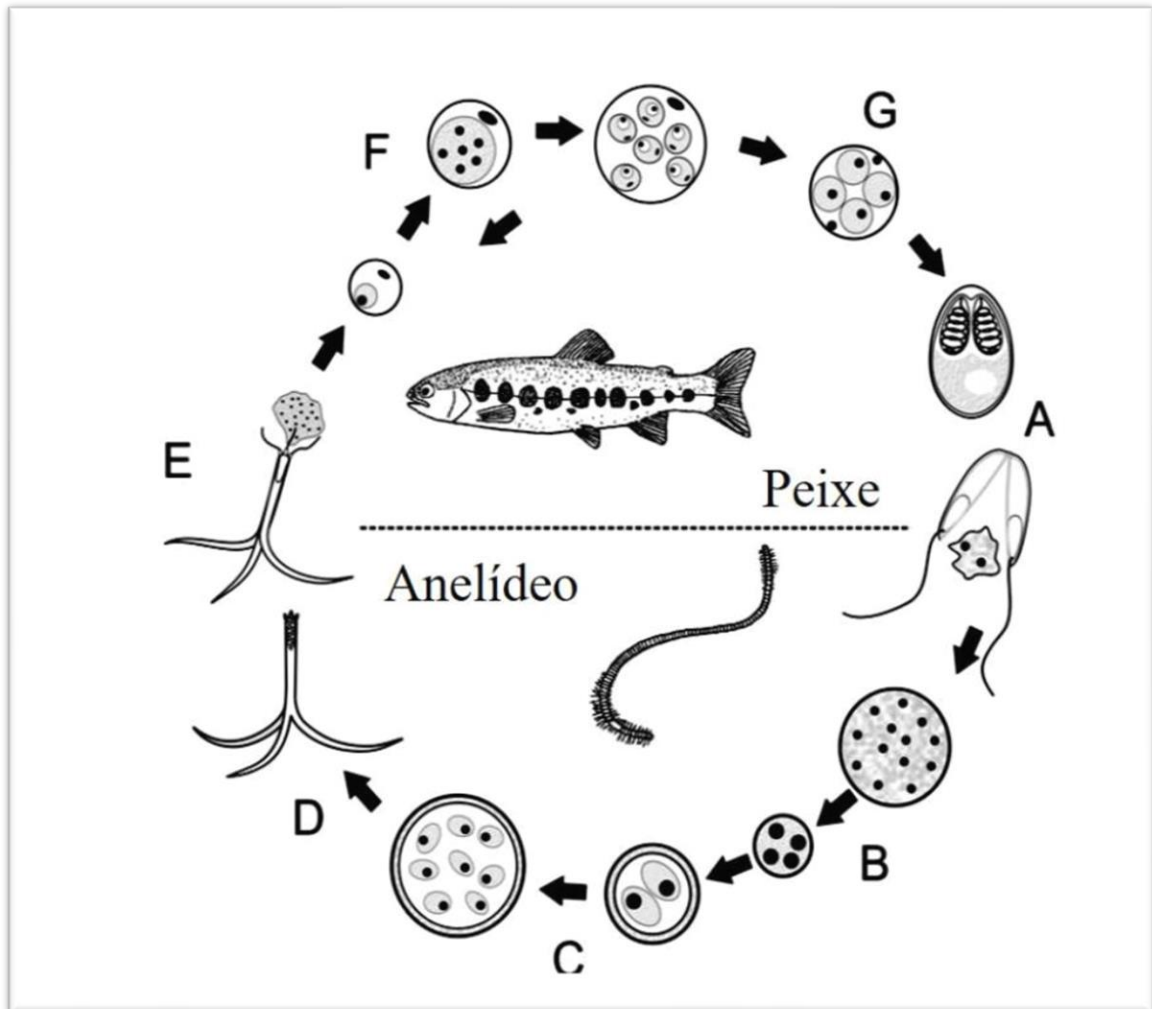
Figura 4- Diversidade filogenética e morfológica dos principais grupos de mixozoários, indicando o tipo de ambiente, famílias e o local preferencial de infecção. A largura das pontas dos ramos concerne a riqueza de espécies para cada grupo.



Fonte: Adaptado de Atkinson *et al.* (2018).

O ciclo de vida dos mixozoários é determinado pela mudança morfológica do esporo, intercalando na forma de actinosporo quando ocorre a transmissão do hospedeiro definitivo, um anelídeo que habita no substrato, para o hospedeiro intermediário vertebrado, o peixe (Figura 5); e a forma de mixosporo quando a transmissão é inversa, caracterizando-se assim uma transmissão horizontal indireta, não totalmente esclarecida; mas sabe-se que os actinosporos liberados na água se fixam na superfície do peixe (brânquias e tegumento) por quimiotaxia ou após a ingestão via oral, ocorrendo a liberação dos filamentos polares auxiliando na ancoragem as células do tecido epitelial e a abertura das valvas que liberam o esporoplasma (LOM; DYKOVA, 1997; LÁSZLÓ *et al.*, 2002; YOKOYAMA *et al.*, 2012).

Figura 5 - Esquema do ciclo de vida dos mixozoários. A – Abertura das valvas e a extrusão dos filamentos polares para a ancoragem no epitélio intestinal. B- Gametogonia. C- Esporogonia da fase actinosporea. D- Actinosporo maduro, após o desenvolvimento dentro de um pansporocisto. E- Ancoragem do actinosporo nas brânquias ou na pele, após a liberação dos filamentos polares, facilitando a fixação. F - Multiplicação pré-esporogônica. G- Esporogonia da fase myxosporea.

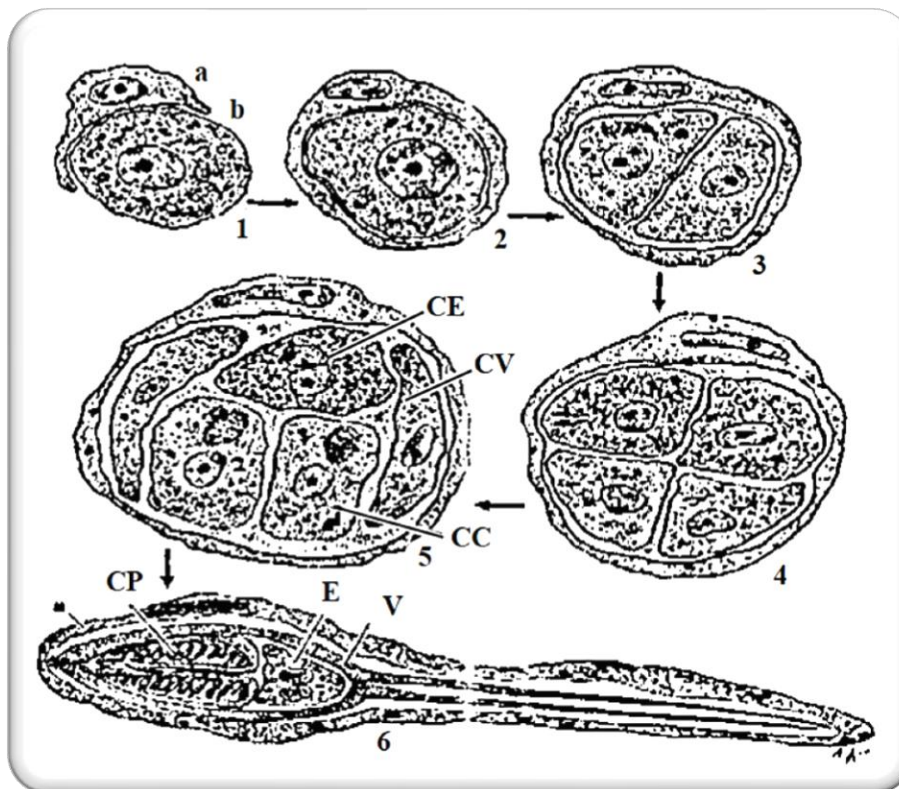


Fonte: Adaptado de Yokoyama *et al.* (2012).

Nos anelídeos os actinosporos são produzidos dentro dos pansporocistos, em fases proliferativas de esquizogonia, gametogonia e esporogonia, formando actinosporos com simetria tri-radial (KENT *et al.*, 2001; YOKOYAMA *et al.*, 2012; OKAMURA *et al.*, 2015). Enquanto a esporogênese para a formação dos mixosporos em peixes é descrita detalhadamente por Matos *et al.*, (2001), iniciando-se quando o pericito, por meio de fagocitose envolve uma célula esporogônica, posteriormente ocorrem sucessivas divisões endógenas (nucleocinese e citocineses) originando células uninucleares, exceto uma que ocorre apenas uma nucleocinese, que apresentará núcleo binucleado, denominada de célula esporoplasmática. Conseqüentemente dois grupos de cinco células são formados, nas quais se diferenciarão em

duas células valvogênicas que englobam as outras três, compondo o esporo. As três células que ficam retidas no interior do esporo, uma e esporoplasmogênica podendo ser mono ou binucleada, com várias vesículas eletrodensas; e duas são capsulogênicas, que compõem as cápsulas polares, contendo cada uma delas no seu interior um filamento polar helicoidal (Figura 6). Essas cápsulas polares são estruturas similares em sua composição com os nematocistos das medusas, mas adaptadas ao parasitismo (AMERICUS *et al.*, 2020).

Figura 6 - Fase esporogênica no hospedeiro intermediário. 1 – Célula pericítica (a) englobando uma célula germinativa (b). 2 – Célula germinativa envolvida pelo pericítico. 3 – 4 Início do processo de divisão celular, por cariocinese e citocinese. 5 – No fim da divisão o esporo apresenta 2 células valvogênicas (CV), 2 células capsulogênicas (CC) e uma célula binucleada – o esporoplasma (CE). 6 – O esporo maduro possui capsulas polares (CP), esporoplasma (E) e valvas (V).



Fonte: Matos *et al.* (2001).

A morfologia do esporo é utilizada para a classificação taxonômica a nível de gênero e as suas estruturas são facilmente distinguíveis em microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) (LOM; DYKÓVA, 1992). Matos *et al.*, (2001) relata que a maioria possui na região externa duas valvas e internamente duas cápsulas e uma célula esporogênica, geralmente binucleada.

Na última década vários estudos têm demonstrado o efeito patogênico de mixozoários em peixes na Amazônia, inclusive em espécies de importância comercial, sendo acometidos

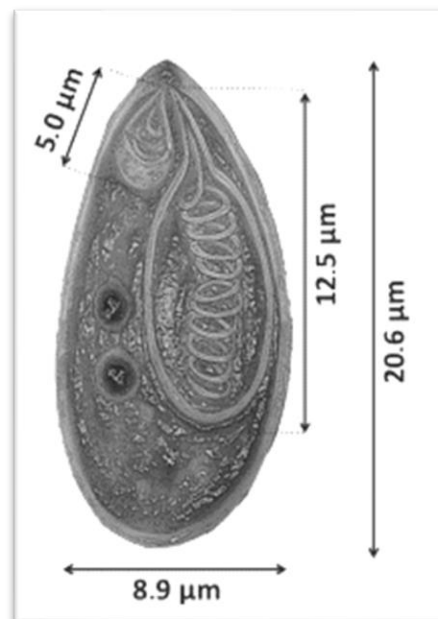
principalmente em relação aos gêneros *Myxobolus* Bütschli 1882, *Henneguya* Thélohan 1892, *Kudoa* Meglitsch 1947, *Ellipsomyxa* KØIE 2003; *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 e *Myxidium* Bütschli, 1882 (AZEVEDO *et al.*, 2013a; OLIVEIRA *et al.*, 2015; VIDEIRA *et al.*, 2015; MATHEWS *et al.*, 2016; ESPINOZA *et al.*, 2017; ZATTI *et al.*, 2018a; VELASCO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; FIGUEREDO *et al.*, 2020).

Em serrasalmídeos 5 espécies de mixozoários foram descritas: *Myxobolus maculatus* em *Metynniss maculatus* (CASAL *et al.*, 2002), *Myxobolus metynniss* em *Metynniss argenteus* (CASAL *et al.*, 2006), *Myxobolus myleus* e *Meglitschia mylei* em *Myleus rubripinnis* (AZEVEDO *et al.*, 2011a, 2012). E *Myxobolus dermatoulcerans* na piranha *Pygocentrus nattereri* oriunda do Peru (STILWELL *et al.*, 2020).

3.3.1 Gênero *Myxobolus* Bütschli 1882.

O gênero *Myxobolus* pertence a ordem bivalvulida e a família myxobolidae, com maior diversidade entre os mixozoários, apresentando mais de 950 espécies descritas, principalmente em peixes, mas também acometem anfíbios e répteis. A morfologia dos mixosporos corresponde a um corpo elipsoidal ou arredondado, com duas cápsulas polares piriformes na região apical de igual tamanho ou desiguais, duas valvas localizadas na linha de sutura lateral e esporoplasma binucleado (Figura 7) (KENT *et al.*, 2001; LOM; DYKOVÁ, 2006).

Figura 7- Desenho esquemático de *Myxobolus* sp.



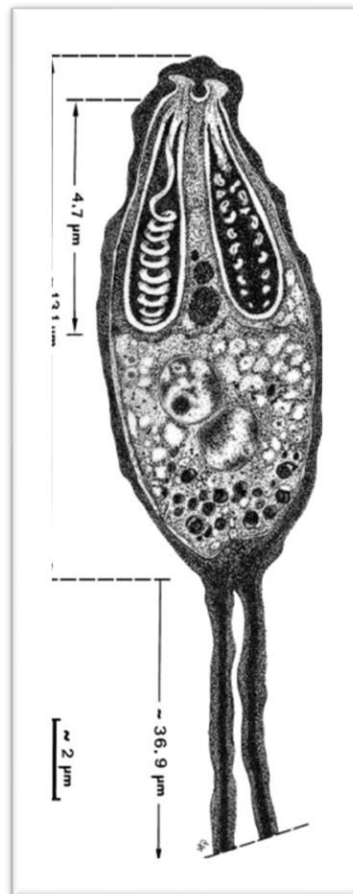
Fonte: Sindeaux Neto *et al.* (2016).

A “doença do rodopio” é a mais conhecida, causada por *M. cerebralis* em salmonídeos principalmente da América do Norte e Europa, consiste em uma infecção na medula espinhal e tronco cerebral, provocando distúrbios nervosos induzindo o nado em círculos e a pigmentação escura da cauda anal, sintomas importantes para o diagnóstico. É considerada um problema de sanidade pois afeta peixes no ambiente natural e em cultivo (HOFFMAN, 1990; ALLEN; BERGERSEN, 2002; LUQUE, 2004).

3.3.2 Gênero *Heneguya* Bütschli 1882.

O gênero *Heneguya* possui mais de 200 espécies descritas em todo mundo (EIRAS; ADRIANO, 2012). Apresentam um corpo do esporo elipsoidal ou piriforme, constituído por duas cápsulas polares com valvas em direção opostas, paralelas a linha de sutura que se prolonga até as projeções caudais. Na região interna, o esporo possui esporoplasma binucleado e filamentos polares em cada cápsula (Figura 8).

Figura 8 – Desenho esquemático de *Heneguya rhamdia*.



Fonte: Matos *et al.* (2005).

A doença causada por esses parasitos é denominada de henneguyose, sendo a maioria histozoica, infectando o coração, cavidade celomática e principalmente as brânquias (FERREIRA *et al.*, 2020; MATHEWS *et al.*, 2020). Esses parasitos podem ser encontrados em hospedeiros selvagens e de cultivo (MARGARIDO *et al.*, 2021; AZEVEDO *et al.*, 2021). O grupo possui a única espécie de eucarioto, *Henneguya salmonicola* um parasito de salmão, que não realiza respiração aeróbica, perdendo no decorrer da evolução o genoma mitocondrial, apresentando vias alternativas para a síntese de energia (YAHALOMI *et al.*, 2020).

3.4 Filo Apicomplexa – Subclasse Coccidia

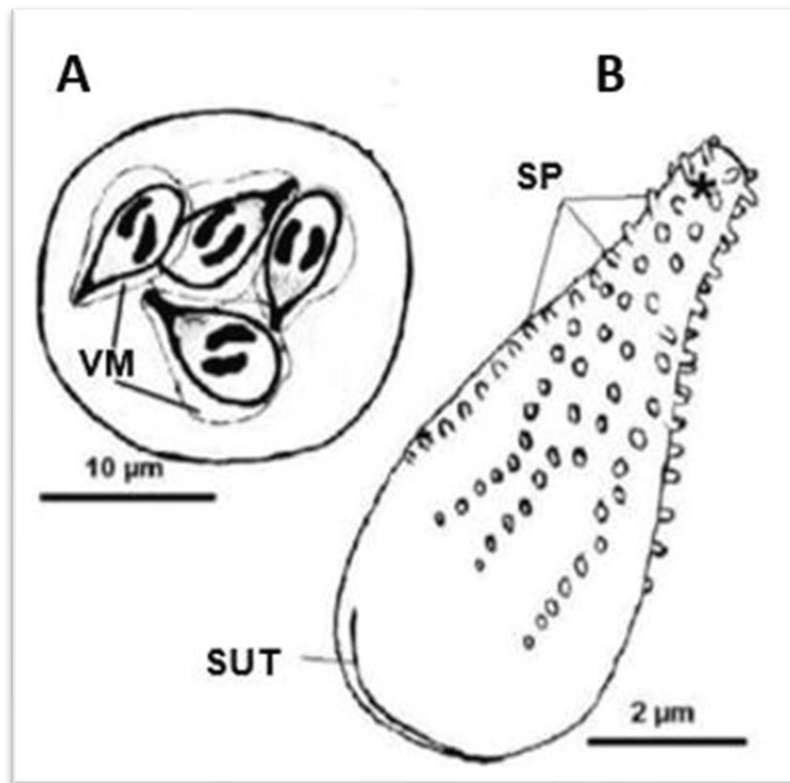
Os apicomplexas são alveolatas, intracelulares obrigatórios, diversificados que abrangem uma grande parte dos animais, são distinguíveis por apresentar em sua estrutura o complexo apical, composto por o anel polar, conóide, roptrias, micronemas e túbulos subpeliculares (LEVINE, 1971; FRÉNAL *et al.*, 2017). Algumas espécies do grupo são conhecidas por causar doenças em humanos como do gênero *Plasmodium*, causador da malária; *Cryptosporidium*, responsável por causar sintomas gastrointestinais agudos em crianças; e o *Toxoplasma gondii* que provoca encefalite toxoplasmática em imunocomprometidos e a possibilidade de ser transmitido para o feto em gestantes, desencadeando a toxoplasmose congênita, podendo resultar em mal formação e até o óbito do feto (SNOW *et al.*, 2005; GALVÃO *et al.*, 2012; DUBEY, 2016).

A sub-classe dos coccídeos são representadas por membros que se desenvolvem nas células epiteliais do trato digestivo do hospedeiro, causando a coccidiose que é uma forma de enterite (BOWMAN *et al.*, 2006). Esses protozoários apresentam ciclo de vida sexuado com a maturação em gametas intracelulares pequenos e assexuado nas células do hospedeiro, alternando entre as formas de merogonia, gametogonia e esporogonia (CLARENCE, 2019). As transmissões podem ocorrer de forma direta ou indireta por meio do hospedeiro intermediário. Entre as espécies de coccídeos de grande interesse ictioparasitológico estão os pertencentes ao gênero *Calyptospora*, da família calyptosporidae.

3.4.1 Gênero *Calyptospora* Overstreet, Hawkins e Fournie 1984.

Os Calyptosporídeos possuem em sua morfologia, características peculiares como um oocisto esférico com quatro esporocistos e cada um apresentando dois esporozoítos, sendo possível observar em microscopia eletrônica de varredura nos esporocistos, a presença de uma linha de sutura, esporopódios e uma membrana que o recobre, denominada de véu membranoso (Figura 9) (OVERSTREET *et al.*, 1984; DA SILVA *et al.*, 2019).

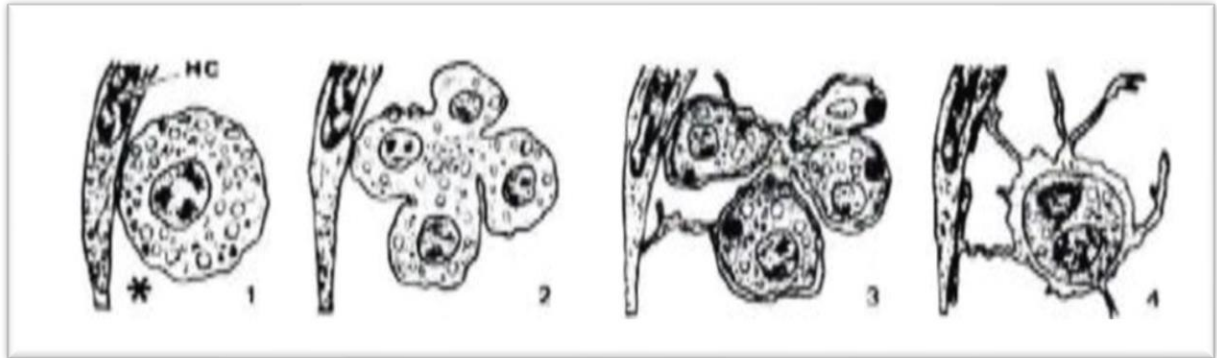
Figura 9 - Desenho esquemático de *C. paranaidji*. A - Oocisto, com destaque o véu membranoso (VM) recobrendo os esporocistos e os esporozoítos na região interna; B- Morfologia externa do esporocisto, ressaltando a sutura (SUT) e os esporopódios (SP).



Fonte: Adaptado de Da Silva *et al.* (2019).

A fase esporogônica de *C. spinosa* é descrita por Azevedo *et al.* (1995), onde na etapa inicial é observado um zigoto dentro de um vacúolo parasitóforo (VP), sofrendo sucessivas nucleocineses alterando o núcleo de uma forma redonda para mais oblíqua enquanto as células hospedeiras em contato com o VP foram lisadas. Em seguida, o zigoto origina células binucleadas e tetranucleadas, ocorrendo o aumento do VP, e alterações na membrana plasmática formando uma rede que posteriormente se funde circundando cada núcleo. Simultaneamente, a membrana externa desenvolve esporopódios longos irregulares em direção as extremidades do VP. Após essa citocinese, o esporoblasto em desenvolvimento se associa próximo a membrana externa, na qual é recoberto formando o véu do esporocisto (Figura 10).

Figura 10 - Fase esporogônica do ciclo de vida de *C. spinosa*; 1- zigoto, com destaque ao vacúolo parasitóforo (*) e a célula hospedeira (HC); 2- Formação do esporoblasto; 3- Esporoblasto maduro; 4- Esporoblasto maduro é envolvido pelo véu do esporocisto.



Fonte: Adaptado de Azevedo *et al.* (1995).

O local de infecção desses microparasitas é o fígado, mas podem ser encontrados também na vesícula biliar. Estudos histopatológicos têm demonstrado a degeneração do parênquima hepático, com resposta inflamatória (BONAR *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2012; SANTIAGO *et al.*, 2012). Atualmente no Brasil foram descritas as seguintes espécies: *C. serrasalmi* (CHEUNG *et al.*, 1986), *C. tucunarensis* (BÉKÉSI; MOLNÁR, 1991), *C. spinosa* (AZEVEDO *et al.*, 1993), *C. paranaidji* (DA SILVA *et al.*, 2019) e *C. gonzaguensis* (SILVA *et al.*, 2020b).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta dos espécimes e transporte

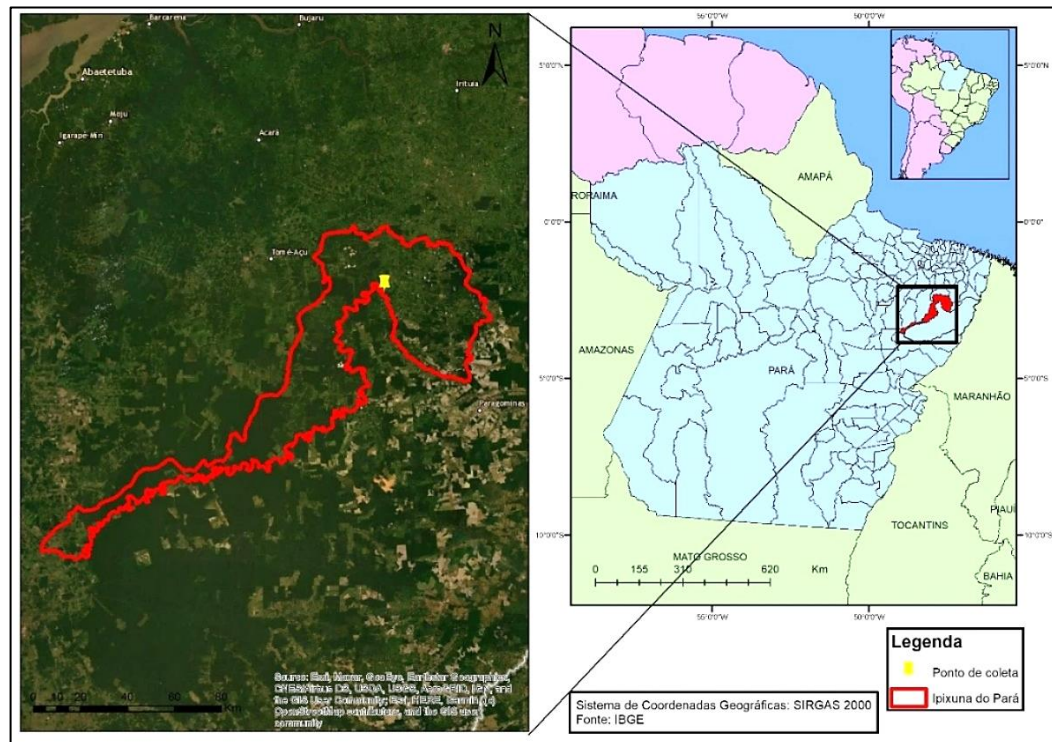
Os espécimes de *M. hypsauchen* e *S. rhombeus* foram coletados entre agosto de 2018 a setembro de 2019, no rio Capim (02°66'67''S 48°32'34''W) (Figura 11) nas proximidades da comunidade ribeirinha Barreta localizada no município de Ipixuna do Pará (Figura 12), enquanto os exemplares de *M. lippincottianus* foram adquiridos trimestralmente entre novembro de 2020 até em dezembro de 2021 no rio Caparu (01°22'37''S 48°09'28''W) (Figura 13) em Santa Izabel do Pará (Figura 14). As localidades pertencem a mesorregião do nordeste do estado do Pará.

Figura 11 – Rio Capim em Ipixuna do Pará.



Fonte: LPCA, 2022.

Figura 12 - Mapa de localização da coleta dos espécimes no município de Ipixuna do Pará.



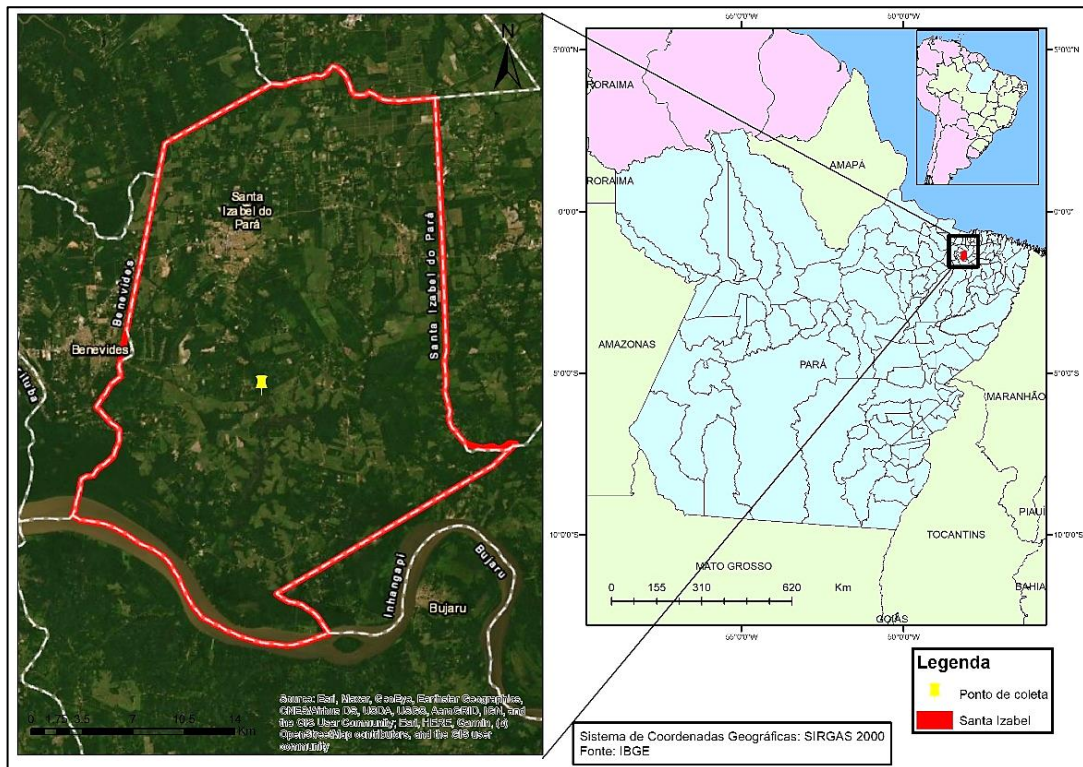
Fonte: LPCA, 2022.

Figura 13- Rio Caraparu em Santa Izabel do Pará.



Fonte: LPCA, 2022.

Figura 14 - Mapa de localização do ponto de coleta dos espécimes no município de Santa Izabel do Pará.



Fonte: LPCA, 2022.

Os animais foram capturados *in situ*, com autorização da Licença do SISBIO/ ICMBio nº27.119. Aparelhos de pesca foram utilizados como: rede de emalhar, anzol com linha de mão, tarrafa, puçá e etc. Em seguida, os espécimes foram transportados vivos em baldes com a água do ambiente e aeração artificial até o Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo (LPCA) do Instituto da Saúde e Produção Animal (ISPA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), campus Belém.

4.2 Eutanásia, necropsia e coleta das amostras

No laboratório, os animais foram anestesiados com Tricaína Metano Sulfonato (MS-222 SIGMA) na concentração de 50mg/L, seguida de mielotomia neural, procedendo de acordo com as recomendações do Comitê de Ética da Utilização de Animais da UFRA (CEUA 013/2014) (ANEXO A). Em seguida, dados biométricos foram adquiridos, como comprimento total no paquímetro e o peso em uma balança de precisão e registrados na ficha de coleta (ANEXO B).

Posteriormente a busca parasitológica ocorreu a partir do exame da superfície corpórea e órgãos internos (brânquias, vesícula biliar, fígado, rins entre outros), por meio da abertura urogenital até o opérculo, utilizando-se de um estereomicroscópio Zeiss Stemi DCR para a identificação de cistos ou e/ou lesões teciduais. Esses fragmentos foram retirados e colocados entre lâmina e lamínula contendo uma gota de água e observados em microscópio de luz (PRIMO STAR ZEISS), para identificação de acordo com as características morfológicas peculiares dos microparasitos. Após a confirmação do parasitismo, as informações foram registradas em uma ficha de protocolo de coleta/necropsia e os fragmentos de tecidos parasitados foram destinados ao processamento histológico e para microscopia eletrônica de varredura.

4.3 Histologia

As amostras contendo fragmentos de tecidos parasitados, foram fixadas em solução de Davidson (formaldeído, ácido acético, álcool 95% e água destilada) em uma proporção de 9:1, em um período de 24h, objetivando a inativação de proteínas que venham ocasionar a autólise do material biológico.

Em seguida procedeu-se a etapa de desidratação, de acordo com o protocolo padronizado do LPCA (ANEXO C), imergindo as amostras em uma concentração alcóolica crescente (70%, 80%, 90%, absoluto I, absoluto II e absoluto III), em um período de 1 hora em cada etapa. Posteriormente realizou-se a diafanização dos tecidos em xilol, a impregnação em

parafina líquida, em um total de três banhos, aquecida em estufa a 62 °C. Após a impregnação em parafina, os tecidos foram incluídos em parafina com auxílio do equipamento Tissue Embedding Center Micron EC35, resultando na formação de blocos contendo tecido + parafina. Os blocos foram cortados a 5 µm de espessura no micrótomo Rotary Microtome Micron HM315, distendidos em banho-maria e “pescados” em uma lâmina de vidro, com o auxílio de uma pinça. Os cortes coletados em lâminas foram submetidos a secagem em estufa a uma temperatura de 62 °C por 24 h. Posteriormente os cortes foram corados em Hematoxilina e Eosina (HE) para observar as alterações citológicas e em Ziehl-Neelsen (ZN) que destacam os cistos/mixosporo no tecido do hospedeiro (LUNA, 1968).

4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Na Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) procedeu-se de acordo com os protocolos padronizado do LPCA (ANEXO D). Os fragmentos de tecido e mixosporos, foram fixados em glutaraldeído 5% tamponados com cacodilato de sódio 0,2 M a pH 7.2 por 3 horas a 4°C. Posteriormente, foram lavados no mesmo tampão por 2-4 horas a 4°C, e pós -fixados em tetróxido de ósmio a 2% no mesmo tampão pelo período de 2 horas na mesma temperatura, e após desidratados, em série crescente de etanol. Expostos em seguida a secagem até ao ponto crítico, e metalizados com ouro ou platina. As visualizações foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura do Laboratório do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG).

4.5 Morfometria e estatística

Os mixosporos a fresco (n=30) foram medidos em micrômetros (µm), no DIC Zeiss AxioCam Erc 5 camera fitted com AxioVision LE software. As variáveis médias, desvio padrão e os valores máximos e mínimos foram adquiridos para a descrição taxonômica de mixozoários preconizados por Lom e Arthur (1989) e Da Silva *et al.*, (2019), para os calyptosporídeos. Enquanto as correlações do tamanho dos mixosporos com as espécies descritas na literatura foram realizadas por meio da estatística multivariada com a análise de componentes principais (ACP) e o método hierárquico UPGMA, ambos realizados no software PAST (HAMMER *et al.*, 2001).

A prevalência parasitária foi calculada de acordo com Bush *et al.* (1997) por meio da fórmula $P = \frac{NTPP}{NTPE} \times 100$, onde: P = prevalência; NTPP = número total de peixes parasitados; NTPE = número total de peixes examinados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas 6 coletas no rio Capim, sendo capturados 20 exemplares de *M. hypsauchen*, com comprimento médio de 16 cm (14,0 - 17,5) cm e peso médio de 10,2 g (8,4 – 12,3)g, dos quais 12 estavam parasitados por *Myxobolus* sp. nos rins e 5 dos 15 espécimes de *S. rhombeus*, com comprimento médio de 20 cm (12,2 – 22,7) cm e peso médio de 30 g (23 – 34)g, apresentavam oocistos de *Calyptospora* sp. no fígado.

Em relação ao rio Caraparu, após a realização de 7 coletas com a captura de 60 exemplares de *M. lippincottianus* com comprimento médio de 5 cm (4 - 6) cm e peso médio de 4 g (4 – 5) g, sendo que em 54 foram visualizadas de forma concomitante ou a presença única do táxon *Henneguya* nas brânquias e *Myxobolus* em sítios de infecção como: rins, fígado, baço e bexiga (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados parasitológicos por hospedeiro.

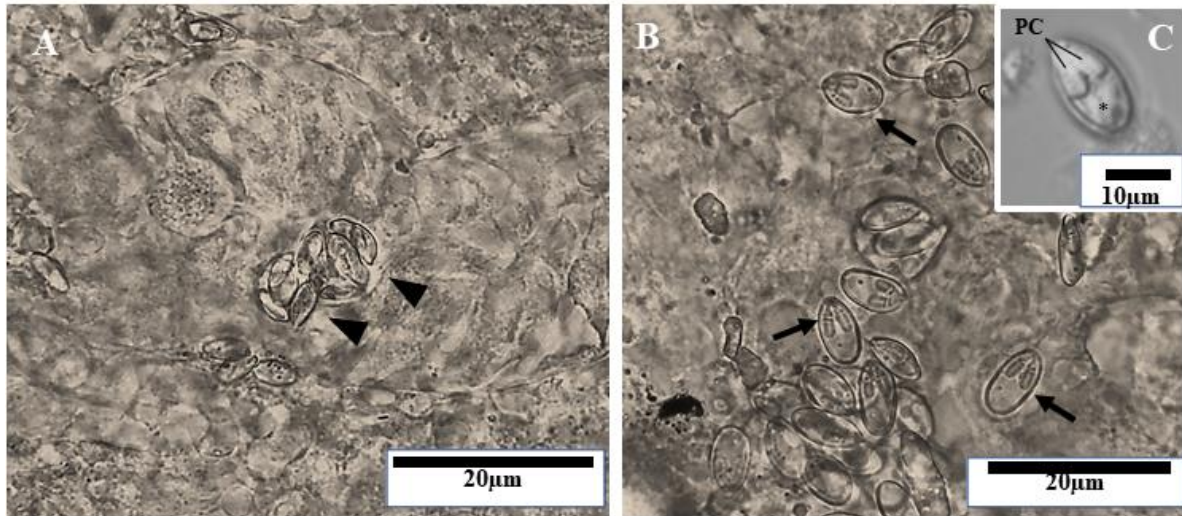
Hospedeiro	Parasita	Local de Infecção	Prevalência	Município
<i>M. hypsauchen</i>	<i>Myxobolus</i>	Rins	(12/20) 60%	Ipixuna do Pará
<i>S. rhombeus</i>	<i>Calyptospora</i>	Fígado	(5/15) 33%	
<i>M. lippincottianus</i>	<i>Henneguya</i>	Brânquias	(48/60) 80%	Santa Izabel
		Rins		
	<i>Myxobolus</i>	Fígado	(45/60) 75%	
		Baço		
		Bexiga		

5.1 *Myxobolus* no rim de *Metynnis hypsauchen*

Em *Metynnis hypsauchen*, cistos e mixosporos com morfologia correspondente ao gênero *Myxobolus* Butschli, 1882, foram observados no rim em uma prevalência de 60% (12/20) (Figura 15A e 15B). Em comparação com outras espécies descritas nesse órgão, os resultados obtidos foram próximos da infecção simultânea de *Myxobolus agolus* e *Myxobolus tilapiae* na tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com 61% (ABDEL-BAKI *et al.*, 2015), sendo menores que *Myxobolus ompok* em *Ompok pabda* com 70% (CHAUDHARY *et al.*, 2018) e *Myxobolus hilarii* em *Brycon hilarii* com 100% (CAPODIFOGGIO *et al.*, 2016). Embora não sendo visualizadas diferenças na prevalência conforme a maturação dos hospedeiros, em ciprídeos *Alburnus alburnus* e *Scardinius erythrophthalmus*, a ocorrência de *Myxobolus* spp. foram maiores em peixes com maturidade sexual em detrimento aos que se encontravam na fase de alevino (MOLNÁR *et al.*, 2009).

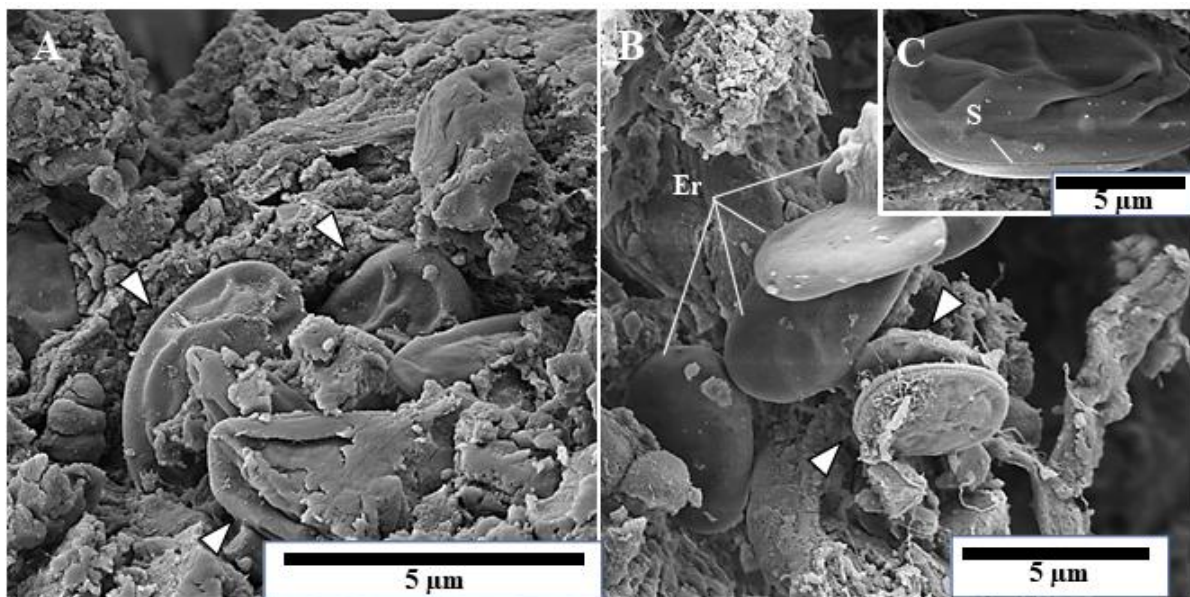
Os mixosporos apresentavam forma elipsoidal, semelhante às espécies descritas na Amazônia como: *Myxobolus colossomatis* (MÓLNAR; BEKÉSI, 1993), *Myxobolus heckelii* (AZEVEDO *et al.*, 2009), *Myxobolus testicularis* (TAJDARI *et al.*, 2009) e *Myxobolus niger* (MATHEWS *et al.*, 2016). As medições morfométricas dos mixosporos maduros foram de 12.5 ± 0.3 (12.3-12.7) μm de comprimento e 7.3 ± 0.2 (7.2-7.5) μm de largura, apresentando uma região de esporoplasma (Figura 15C), continham duas cápsulas polares simétricas e alongadas com 6.2 ± 0.2 (6.1 – 6.3) μm de comprimento e 2.8 ± 0.07 μm de largura. Os filamentos polares foram de 8 a 10 voltas. Em MEV as valvas e a linha de sutura entre elas foram visualizadas (Figura 16A - C).

Figura 15 – Fotomicrografias de *Myxobolus* sp. nos rins de *M. hypsauchen*. A- Cistos (ponta da seta). B- Indicação de mixosporos maduros. C- Detalhes da estrutura dos mixosporos, com a proeminências das cápsulas polares (PC).



Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.*, (2020).

Figura 16 - Fotomicrografias em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Myxobolus* sp. nos rins de *M. hypsauchen*. A e B Indicação de Mixosporos (Ponta da seta) próximo a eritrócitos (Er). C – Destaque para a linha de sutura (S) lateral do esporo.



Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.*, (2020).

Myxobolus sp., correlacionou-se negativamente em relação a *M. metynnis* e *M. aureus*, sendo essas duas últimas as mais próximas entre todas as espécies (Figura 17), influenciado principalmente por comprimento e largura dos mixosporos (Tabela 2). Essa análise morfológica não indicou aproximações entre hospedeiros pertencentes ao mesmo grupo, tropismo por tecido e área geográfica próxima, como ocorre em inferências moleculares para parasitos da família Myxobolidae (ANDREE *et al.*, 1999; CARRIERO *et al.*, 2013; ATKINSON *et al.*, 2015; SINDEAUX-NETO *et al.*, 2021; KSEPKA; BULLARD, 2021).

Figura 17 – Análise de Componentes Principais (ACP) dos dados morfométricos de *Myxobolus* spp. CE: Comprimento do Mixosporo. LE: Largura do Mixosporo. CCP: Comprimento das Cápsulas Polares. LCP: Largura das Cápsulas Polares.

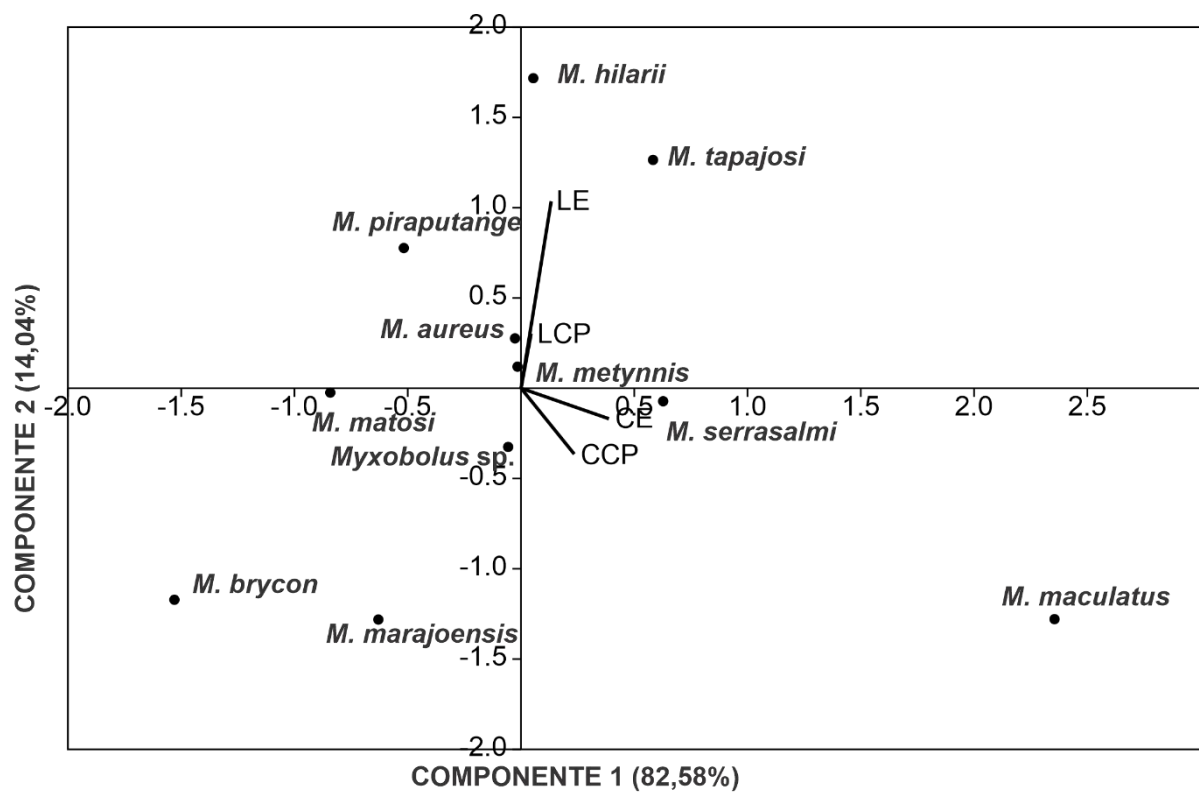


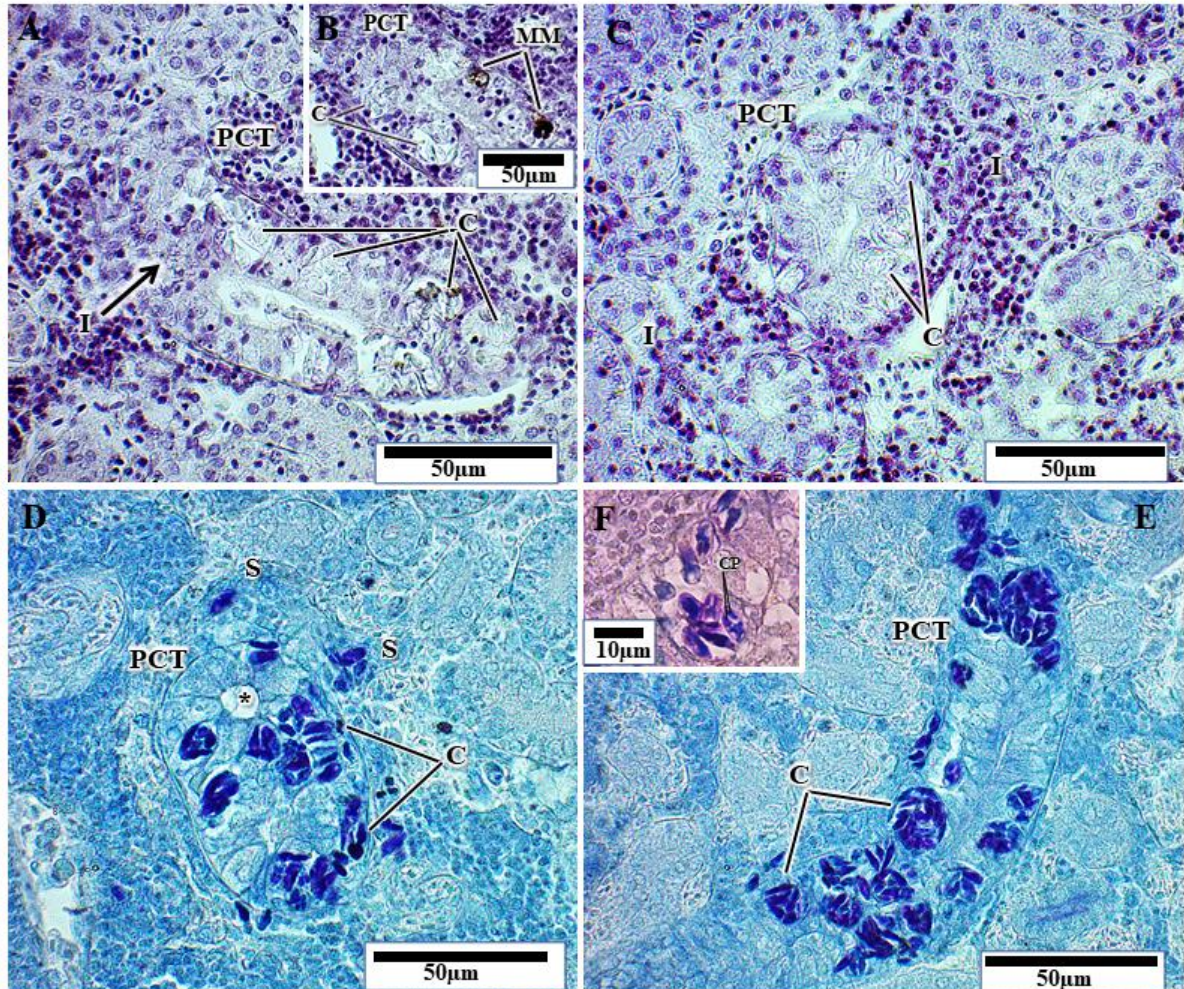
Tabela 2 - Dados morfométricos (μm) de *Myxobolus* spp. descritos no Brasil. NVFP - Número de voltas do filamento polar.

Espécie/Referência	Mixosporo		Cápsula Polar		NVFP	Hospedeiro	Local de Infecção	Localidade
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura				
<i>Myxobolus</i> sp. (Presente estudo)	12.5	7.3	6.2	2.8	8-10	<i>Metynnis hypsauchen</i>	Rim	Pará
<i>M. maculatus</i> Casal <i>et al.</i> , (2002)	21.0	8.9	12.7	3.2	14-15	<i>Metynnis maculatus</i>	Rim	Pará
<i>M. serrasalmi</i> Walliker <i>et al.</i> , (1969)	14.8	8.6	7.7	3.1	-	<i>Serrasalmus rhombeus</i>	Rins	Amazonas
<i>M. hilarii</i> Capodifoglio <i>et al.</i> , (2016)	11.5	11	6.5	4	5-7	<i>Brycon hilarii</i>	Rim	São Paulo
<i>M. tapajosi</i> Zatti <i>et al.</i> , (2018a)	15	10.7	5.8	3	6-7	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Brânquias	Pará
<i>M. aureus</i> Carriero <i>et al.</i> , (2013)	12.6	8.3	5.7	2.9	7-8	<i>Salminus brasiliensis</i>	Fígado	Mato Grosso
<i>M. brycon</i> Azevedo <i>et al.</i> , (2011b)	6.9	4.2	4.2	1.9	8-9	<i>Brycon hilarii</i>	Brânquias	Mato Grosso do Sul
<i>M. piraputangae</i> Carriero <i>et al.</i> , (2013)	10.1	8.7	5.2	3.0	4-5	<i>Brycon hilarii</i>	Rim	Mato Grosso
<i>M. metynnis</i> Casal <i>et al.</i> , (2006)	13.1	7.8	5.2	3.2	8-9	<i>Metynnis argenteu</i>	Região Orbicular	Pará
<i>M. marajoensis</i> Abrunhosa <i>et al.</i> , (2017)	10.9	5.1	5.2	1.5	-	<i>Rhamdia quelen</i>	Intestino	Pará
<i>M. matosi</i> Capodifoglio <i>et al.</i> , (2019)	9.6	7.0	4.3	1.9	-	<i>Colossoma macropomum</i>	Opérculo	Pará

No rim os exames histológicos indicaram que os cistos estavam localizados na parede do túbulo renal proximal, causando a deformação das células cúbicas e modificação do lúmen. Alguns mixosporos encontravam-se no interstício (Figura 18A a 18E). Esse é um dos locais preferências para o desenvolvimento de mixozoários (MOLNÁR *et al.*, 2007). Em estágios mais avançados podem ocasionar na compressão dos túbulos e capilares adjacentes (CAPODIFOGGIO *et al.*, 2016). Essas características histopatológicas concernem em muitos aspectos com o processo de degeneração hialina, que segundo Maftuch *et al.*, (2018) é caracterizado por células tubulares inchadas, encolhimento do lúmen tubular, com o aparecimento de objetos hialinos de coloração rosa em HE, apesar desse último não ser visualizado.

Infiltrado de células mononucleares e melanomacrófagos foram encontrados próximos aos cistos (Figura 18A-C), indicando uma resposta imunológica aos mixosporos, semelhantemente aos achados de outros estudos (MANRIQUE *et al.*, 2017; BATUEVA, 2020). O processo inflamatório é causado pela ausência do encapsulamento por tecido conjuntivo, que reveste em multicamadas mixosporos e cistos (ABDEL-BAKI *et al.*, 2015). A capacidade fagocítica dos melanomacrófagos possibilita no transporte de mixosporos para órgãos como os rins, baço e fígado (OGAWA *et al.*, 1992). Em ZN características morfológicas foram evidenciadas, como as cápsulas polares (Figura 18F). Os dados apresentados foram publicados em artigo (Apêndice A).

Figura 18 – Fotomicrografia histológicas do rim de *M. hypsauchen*. A, B e C - Cistos de mixosporos maduros (C) causando compressão e deformação no epitélio cubóide do túbulo renal proximal (PCT). Presença do infiltrado mononuclear inflamatório (I) ao redor do túbulo infectado e a área de necrose multifocal (seta) e melanomacrófagos (MM) em HE. D e E - Cistos no epitélio cubóide dos túbulos renal proximal (PCT), causando deformação e deslocamento do lúmen (*) para o lado do túbulo. Observação de mixosporos livres no parênquima renal (S). F- Detalhe das cápsulas polares (CP) no esporo.



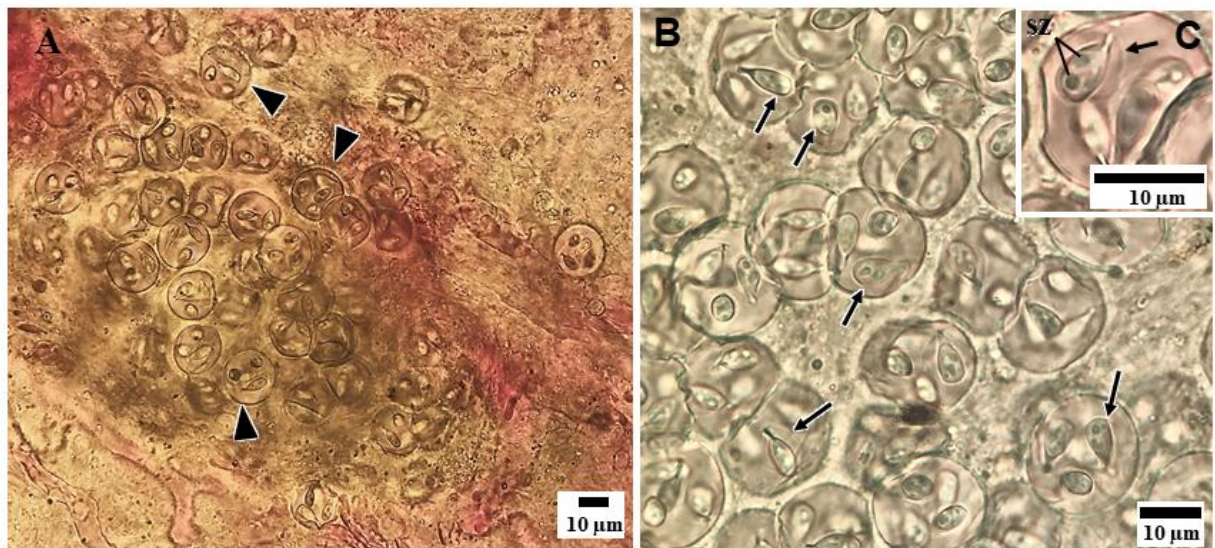
Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.*, (2020).

5.2 *Calyptospora* no fígado de *S. rhombeus*

Em fragmentos do fígado observados em microscopia de luz, oocistos estavam presente em uma prevalência de 33% (Figura 19A), geralmente as taxas de infecção são elevadas para esse coccídeo, portanto a deste estudo foi superior somente a *C. gonzaguensis* em *Triporthus angulatus*, com 4.2 % (SILVA *et al.*, 2020b). Não foram observadas lesões hepáticas que causassem o embranquecimento do órgão, como diagnosticado por Velasco *et al.*, (2012) e Videira *et al.*, (2013).

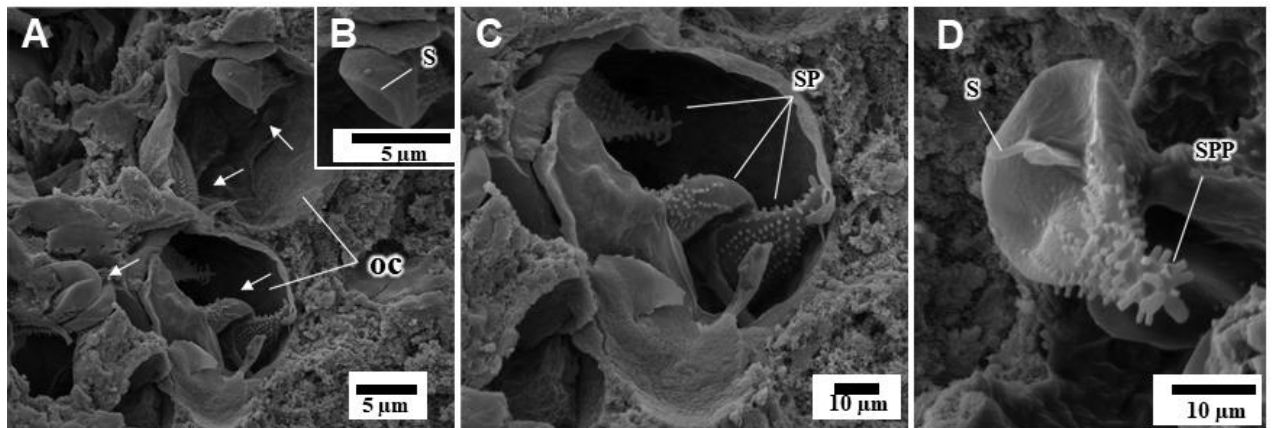
Os oocistos esféricos apresentaram 17.4 ± 1.0 (15.7-19) μm de diâmetro, com quatro esporocistos piriformes, mensurando 8.33 ± 1.1 (6- 10) μm de comprimento e 4.29 ± 0.83 (3-4.68) μm de largura (Figura 19B e 20A e 20C). Internamente apresentavam dois esporozoítos e eram revestidos por um véu membranoso (Figura 19C). Detalhes estruturais dos esporocistos em MEV, destacaram a sutura apical e as projeções laterais, os esporopódios (Figura 20B e 20D).

Figura 19 - Fotomicrografias em ML de *Calyptospora* sp. infectando o fígado de *S. rhombeus*. A- Aglomerados de oocistos. B- A ponta da seta indica esporocistos dentro dos oocistos. C- Destaque da estrutura do esporocisto, com esporozoítos (SZ) e véu membranoso (ponta de seta).



Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.*, (2021).

Figura 20 - Fotomicrografias em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Calyptospora* sp. no fígado de *S. rhombeus*. A- Oocistos (OC) compostos por 4 esporocistos (seta). B-D- Esporocisto (SP), com ênfase na sutura (S) e esporópodos (SPP).



Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.*, (2021).

A Análise de Componentes Principais de *Calyptospora* spp. demonstrou uma forte associação em relação a variável comprimento/largura entre oocisto e esporocisto, com 92,1% da variância em ambos os eixos, no entanto observa-se uma grande oscilação entre os componentes (Figura 21). *Calyptospora* sp.1 esteve em uma correlação negativa com *C. gonzaguensis* e *Calyptospora* sp.4, aproximação condizente com o diâmetro do oocisto e compartilhamento da forma piriforme dos esporocistos (Tabela 3). A morfologia de *Calyptospora* sp. 1 esteve distante de oocistos descritos em serrasalmídeos como *C. serrasalmi*.

Figura 21 - Análise de Componentes Principais (ACP) dos dados morfométricos de *Calyptospora* spp. DO- Diâmetro do Oocisto; CE- Comprimento do Esporocisto; LE- Largura do Esporocisto; O:E – Relação comprimento por largura do oocisto para o esporocisto.

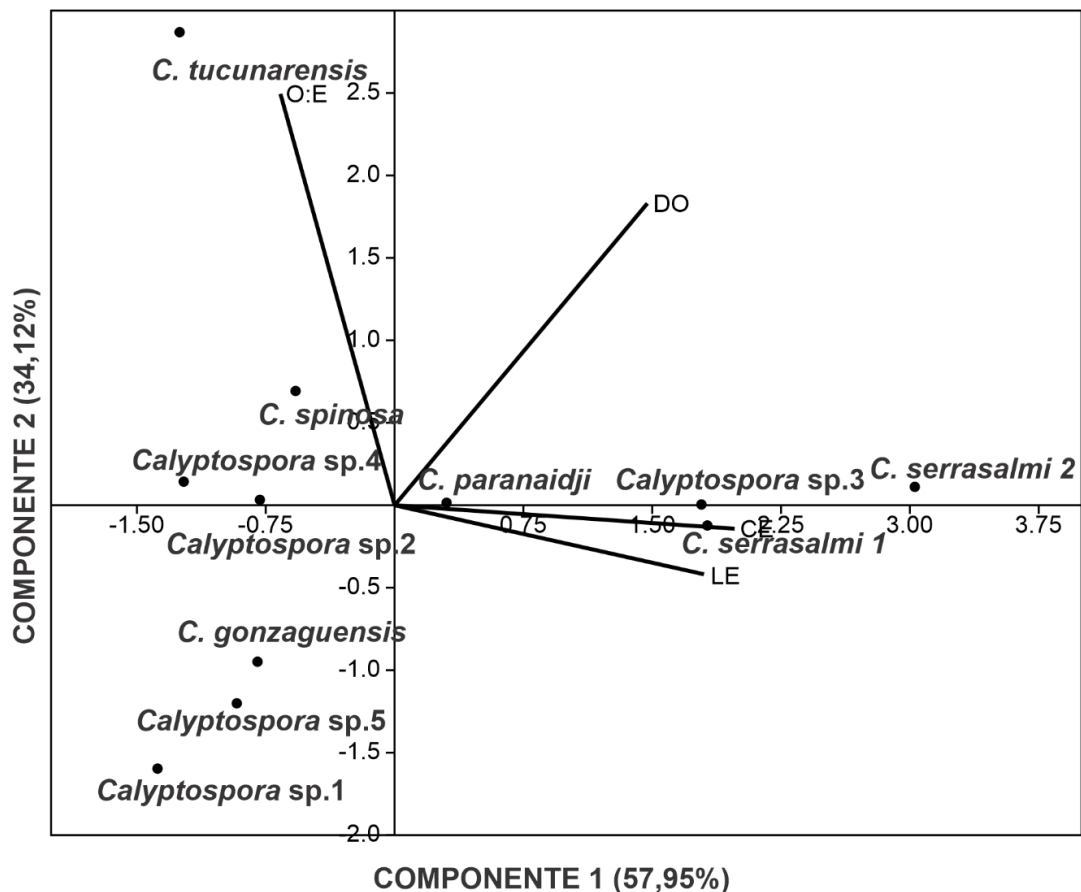


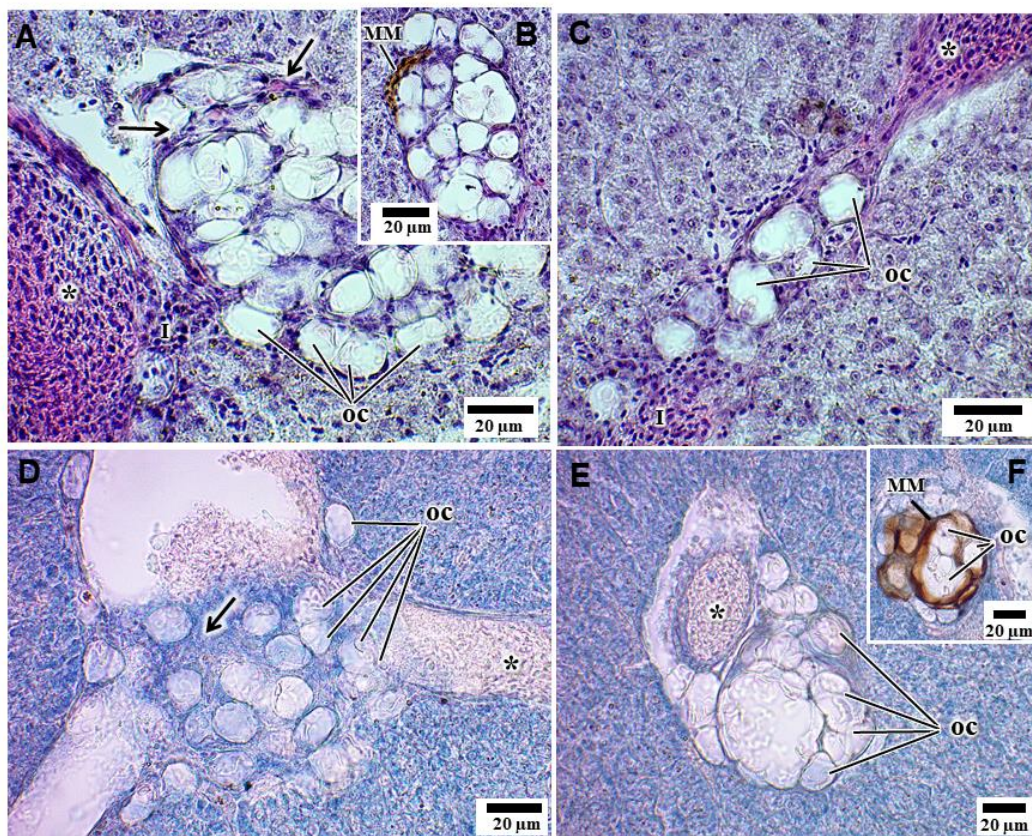
Tabela 3 - Dados morfométricos (μm) de *Calyptospora* spp. Diâmetro do Oocisto (OD). Relação comprimento por largura do oocisto para o esporocisto (O:E).

Espécie /Referência	OD	O:E	Esporocisto		Hospedeiro	Local de Infecção	Localidade
			Forma	Comprimento Largura			
<i>Calyptospora</i> sp.1 (Presente estudo)	17.4	2.1	Piriforme	8.3 4.3	<i>Serrasalmus rhombeus</i>	Fígado	Pará
<i>C. serrasalmi</i> 1 Cheung <i>et al.</i> , (1986)	23.5	2.2	Piriforme	10.7 5.5	<i>Serrasalmus niger</i>	Fígado	Amazonas e Pernambuco
<i>C. tucunarensis</i> Békési & Molnár (1991)	24.3	2.9	Elipsoidal	8.3 3.7	<i>Cichla ocellaris</i>	Fígado	Ceará
<i>C. spinosa</i> Azevedo <i>et al.</i> , (1993)	22.3	2.4	Elipsoidal	9.3 3.8	<i>Crenicichla lepidota</i>	Fígado e gônadas	Pará
<i>Calyptospora</i> sp. 5 Bonar <i>et al.</i> , (2006)	19	2.1	Piriforme	9 4	<i>Arapaima gigas</i>	Fígado	Amazonas
<i>C. serrasalmi</i> 2 Casal <i>et al.</i> , (2007).	25.4	2.2	Piriforme	11.7 5.9	<i>S. striolatus</i> e <i>S. rhombeus</i>	Fígado	Pará e Pernambuco
<i>Calyptospora</i> sp. 3 Albuquerque & Brasil-Sato (2010)	24.5	2.1	Elipsoidal	11.5 4.5	<i>Triportheus guentheri</i> e <i>T. chalceus</i>	Fígado e Intestino	Minas Gerais
<i>Calyptospora</i> sp. 2 Silva <i>et al.</i> , (2012)	20.8	2.3	Piriforme	8.9 4.1	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	Fígado	Pará
<i>Calyptospora</i> sp. 4 Santiago <i>et al.</i> , (2012)	21.2	2.3	Piriforme	9.2 3.1	<i>Cichla temensis</i>	Hepatopâncreas	Pará
<i>C. paranaidji</i> Da Silva <i>et al.</i> , (2019)	22.1	2.3	Piriforme	9.7 4.6	<i>Cichla piquiti</i>	Fígado	Maranhão
<i>C. gonzaguensis</i> Silva <i>et al.</i> , (2020)	19.6	2.1	Piriforme	9.2 3.9	<i>Triportheus angulatus</i>	Fígado, vesícula biliar e tecido adiposo	Maranhão

Na histologia, os oocistos formavam aglomerados no parênquima hepático, próximo a regiões vascularizadas (Figura 22) semelhante a Silva *et al.*, (2020). As agregações oocísticas podem ser sustentadas por células retoteliais, como foi visualizado em uma infecção no hepatopâncreas (BÉKÉSI; MOLNÁR, 1991). Ocorreram degeneração tecidual, por necrose e a ocorrência de fibrose, com células hepáticas exibindo núcleos picnóticos e citoplasma rendilhado (Figura 22A e 22D). Casal *et al.*, (2007), também observou o encapsulamento dos oocistos por tecido conjuntivo, causando deformação celulares.

Também foram visualizados infiltrados de células mononucleares (Figura 22 C), assim como a presença de melanomacrófagos (Figura 22B e 22F). Em infecções mais severas o processo inflamatório pode causar na morte do hospedeiro, como ocorreu com *Arapaima gigas* (BONAR *et al.*, 2006). Esses dados histológicos e morfológicos foram discutidos detalhadamente no artigo (Apêndice B).

Figura 22 - Fotomicrografia histológica da infecção de *Calyptospora* sp. no fígado de *Serrasalmus rhombeus*. A, C e E- Oocistos disseminados no tecido hepático próximo aos vasos sanguíneos (*), com presença de fibroblastos (ponta de seta) e infiltrado de células mononucleares (I). B e F Indicam melanomacrófagos (MM) em torno dos oocistos. D revela necrose generalizada, degeneração hepática (ponta de seta) e a presença de glóbulos vermelhos (*) em tecido corado com ZN.



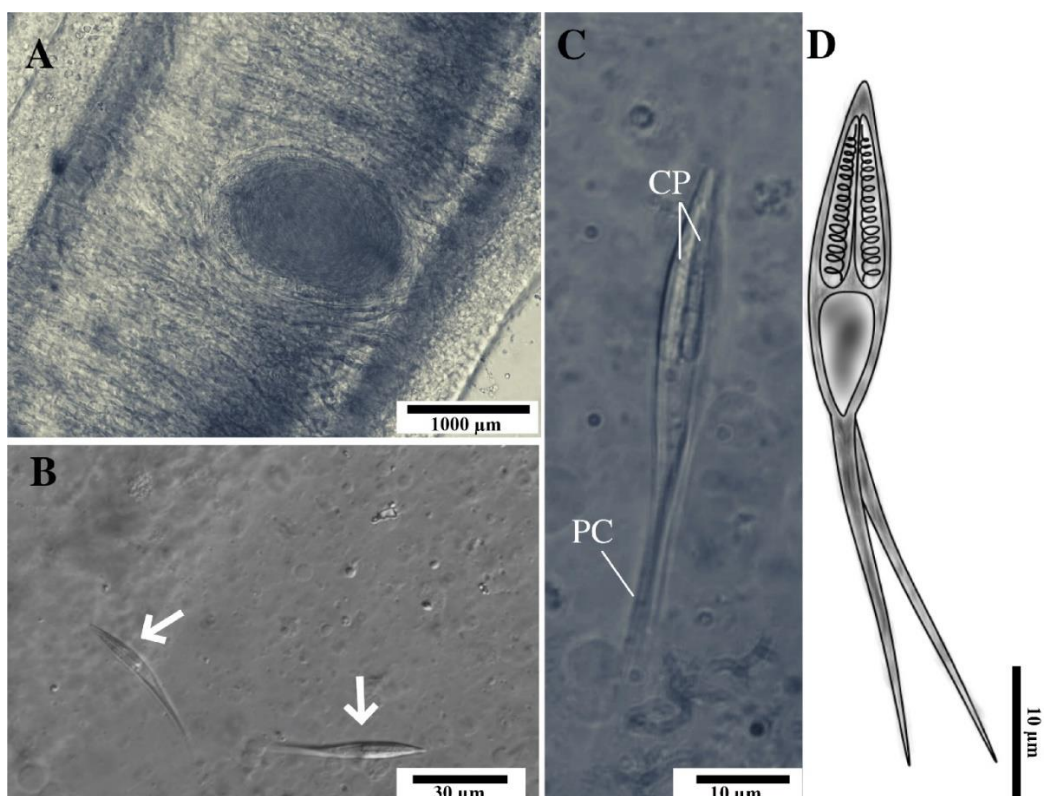
Fonte: Adaptado de Oliveira *et al.*, (2021).

5.3 *Henneguya* nas brânquias de *M. lippincottianus*

Em 80% (46/60) dos exemplares de *M. lippincottianus*, foram observados cistos nas brânquias (Figura 23A), após o rompimento destes, foram observados mixosporos com características taxonômicas do gênero *Henneguya* (Thélohan, 1892) (Figura 23B). Os dados de prevalência foram menores que *Henneguya chydadea* nas brânquias de *Astyanax altiparanae* com 88,3% (BARASSA *et al.*, 2003) e similares aos encontrados por Velasco *et al.*, (2015) na infecção de *Henneguya* sp. no tecido ósseo dos filamentos brânquias de *Hypophthalmus marginatus*, Figueredo *et al.*, (2020) em *M. hypsauchen* e Carvalho *et al.*, (2020) nesse mesmo hospedeiro.

Os dados morfométricos foram os seguintes: tamanho total do esporo foi de $52,5 \pm 0,9$ ($51,4-53,5$) μm , apresentando uma cauda com $20,8 \pm 0,96$ ($20,1-22,4$) μm de comprimento. O corpo do esporo era alongado com $28,7 \pm 0,67$ ($27,9-29,5$) μm de comprimento e $4,2 \pm 0,5$ ($3,5-4,8$) μm de largura, continham cápsulas polares de tamanhos iguais perpendiculares ao eixo longitudinal com $15,7 \pm 1,13$ ($13,9-16,4$) μm de comprimento e $1,9 \pm 0,26$ ($1,9-2$) μm de largura, internamente as voltas dos filamentos polares eram de 15 a 18 (Figura 23C-D).

Figura 23 - Fotomicrografias em DIC de *Henneguya* sp. infectando as brânquias de *M. lippincottianus*. A- Cisto localizado na brânquia. B- Mixosporo de *Henneguya* sp. (ponta da seta). C- Destaque para detalhes morfológicos dos Mixosporo, como as Cápsulas Polares (CP) e as projeções caudais (PC). D- Desenho esquemático de *Henneguya* sp.



A análise das comparações morfométricas entre *Henneguya* spp. descritos na Amazônia, demonstrou que *Henneguya* sp.1, apresentou uma correlação positiva em relação ao componente 1 com *Henneguya* sp.2 e *Henneguya* sp.3 (Figura 24), ambos descritos em hospedeiros do gênero *Metynnis*, atribuindo-se principalmente a variável tamanho do corpo do esporo (Tabela 4). Presume-se que em decorrência das divergências morfológicas entre os *Henneguya* spp. para os serrasalmídeos, o mixosporo apresentado seja uma nova espécie, no entanto somente essas informações não são suficientes para a descrição de novos táxons de mixozoários, necessitando assim da complementação de dados moleculares com o sequenciamento das subunidades ribossomais 18S e 28S, até mesmo para a elucidação de problemas intraespecíficos (FIALA *et al.*, 2006; CECH *et al.*, 2012).

Figura 24 - Análise de Componentes Principais (ACP) dos dados morfométricos de *Henneguya* spp. TT – Tamanho Total. CE - Comprimento do Corpo do Esporo. LE – Largura do Corpo do Esporo. CC- Comprimento Caudal. CCP – Comprimento das Cápsulas Polares. LCP – Largura das Cápsulas Polares.

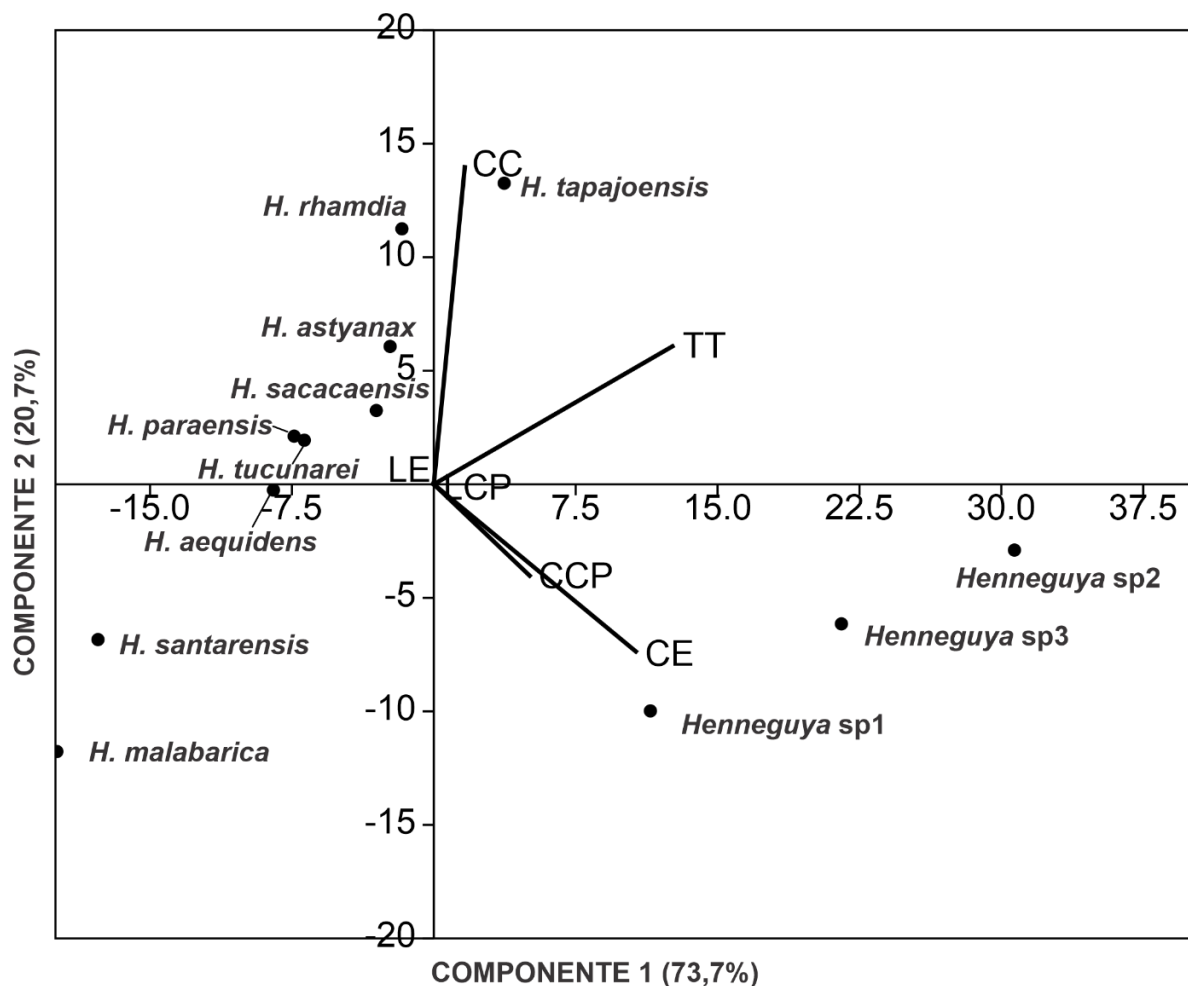
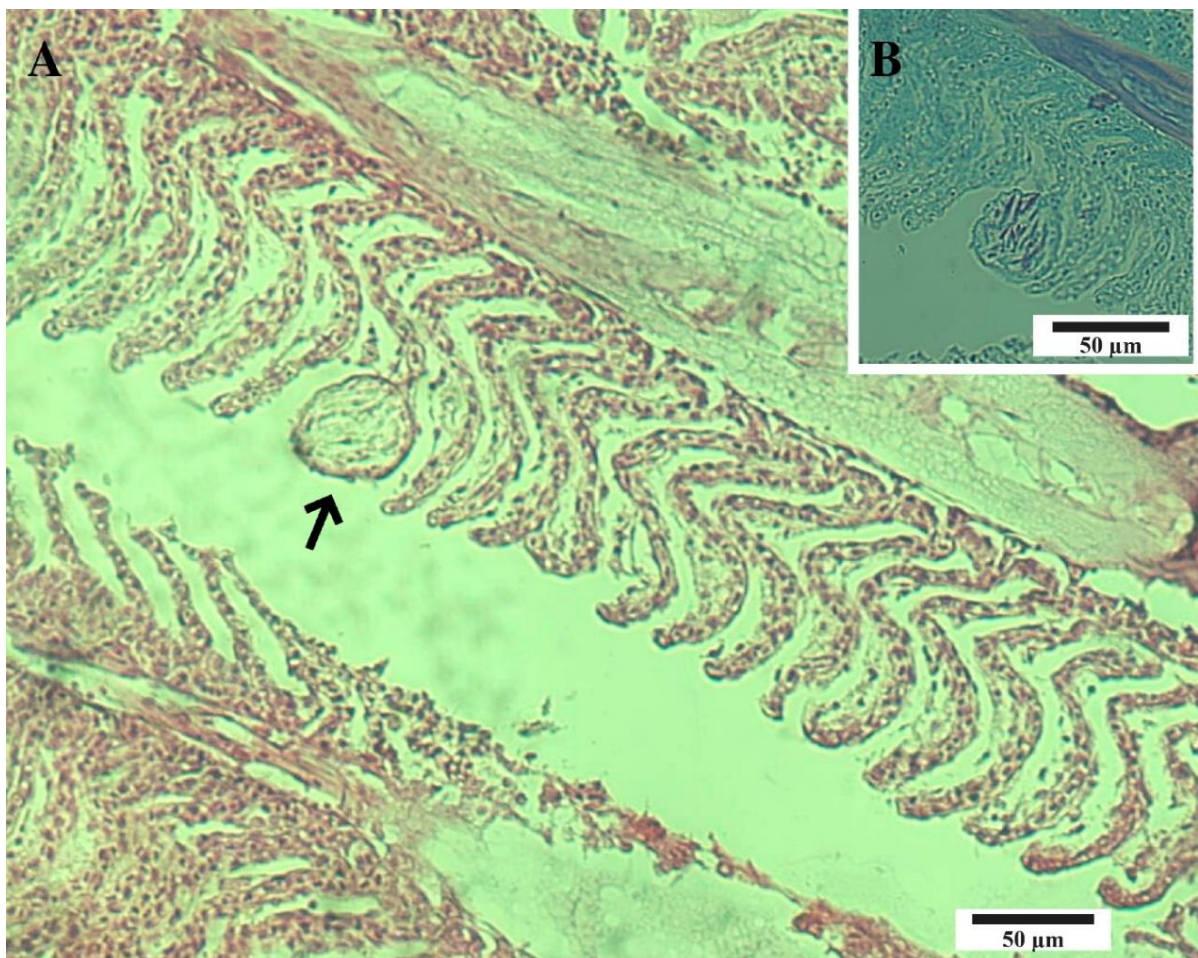


Tabela 4- Dados morfométricos (μm) de *Henneguya* spp. em hospedeiros da Amazônia. TT: Tamanho total. CC: Comprimento da cauda. NVFP: Número de voltas do filamento polar.

Espécie /Referência	TT	Corpo do Mixosporo		CC	Cápsula Polar		NVFP	Hospedeiro	Local de Infecção	Localidade
		Comprimento	Largura		Comprimento	Largura				
<i>Henneguya</i> sp.1 (Presente estudo)	52.5	28.7	4.2	20.8	15.7	1.9	15-18	<i>M. lippincottianus</i>	Brânquias	Pará
<i>H. astyanax</i> Vita et al., (2003)	47.8	15.2	5.7	32.6	5.0	1.5	8-9	<i>Astyanax keithi</i>	Brânquias	Pará
<i>H. rhamdia</i> Matos et al., (2005)	50	13.1	5.2	36.9	4.7	1.1	10-11	<i>Rhamdia quelen</i>	Brânquias	Pará
<i>H. malabarica</i> Azevedo e Matos (1996)	28.3	12.6	8.6	17.1	3.7	1.8	6-7	<i>Hoplias malabaricus</i>	Brânquias	Pará
<i>H. aequidens</i> Videira et al., (2015).	41	15	6	27	3	3	4-6	<i>Aequidens plagiozonatus</i>	Brânquias	Pará
<i>H. paraensis</i> Velasco et al., (2016)	42.3	12.8	8.6	29.5	7.4	2.6	5-7	<i>Cichla temensis</i>	Brânquias	Pará
<i>H. santarensis</i> Naldoni et al., (2018)	31.9	10.8	4.3	21	4.6	1.4	15	<i>Phractocephalus hemioliopus</i>	Brânquias	Pará
<i>H. tucunareii</i> Zatti et al., (2018b)	43.8	14	6.1	28.1	3.4	2	3-4	<i>Cichla monoculus</i>	Brânquias	Pará
<i>H. tapajoensis</i> Zatti et al., (2018b)	54.6	16.4	7	39	4.2	2.1	4-5	<i>Cichla pinima</i>	Brânquias	Pará
<i>Henneguya</i> sp.2 Carvalho et al., (2020).	67.4	37.9	7.2	29.91	22.3	2.47	-	<i>M. lippincottianus</i>	Brânquias	Amapá
<i>Henneguya</i> sp.3 Figueredo et al., (2020)	61.9	38.2	5.8	23.7	6,1	1.8	-	<i>M. hypsauchen</i>	Brânquias	Pará
<i>H. sacacaensis</i> Ferreira et al., (2020)	46.5	16.5	5.1	30	3.83	1.68	7-9	<i>Satanoperca jurupari</i>	Brânquias	Amapá

Os resultados histológicos, mostraram cistos intralamelar, concernindo com a classificação para mixozoários nas brânquias (MOLNÁR, 2002). Foram observados a deformação das células epiteliais (Figura 25A), mas não a fusões das lamelas secundárias e vasos adjacentes, necrose e infiltrado de células inflamatórias, como relatado em outros estudos (ADRIANO *et al.*, 2005; VELASCO *et al.*, 2015; FIGUEREDO *et al.*, 2020). O mixosporos localizavam-se no centro do cisto (Figura 25B), semelhante a forma de desenvolvimento assíncrona, com os mixosporos imaturos nas extremidades (HALLETT; DIAMANT, 2001; CASAL *et al.*, 2003; VIEIRA *et al.*, 2020). A intensidade da infecção não ocasionou na morte do hospedeiro, por meio da asfixia, como ocorreu com *Henneguya* spp. (HAAPARANTA *et al.*, 1994; YOKOYAMA *et al.*, 2003).

Figura 25 - Microfotografias histológicas de *Henneguya* sp. nas brânquias de *M. lippincottianus*. A- Seta indicando cisto intralamelar. corado em HE. B- Mixosporos destacados em coloração de ZN.



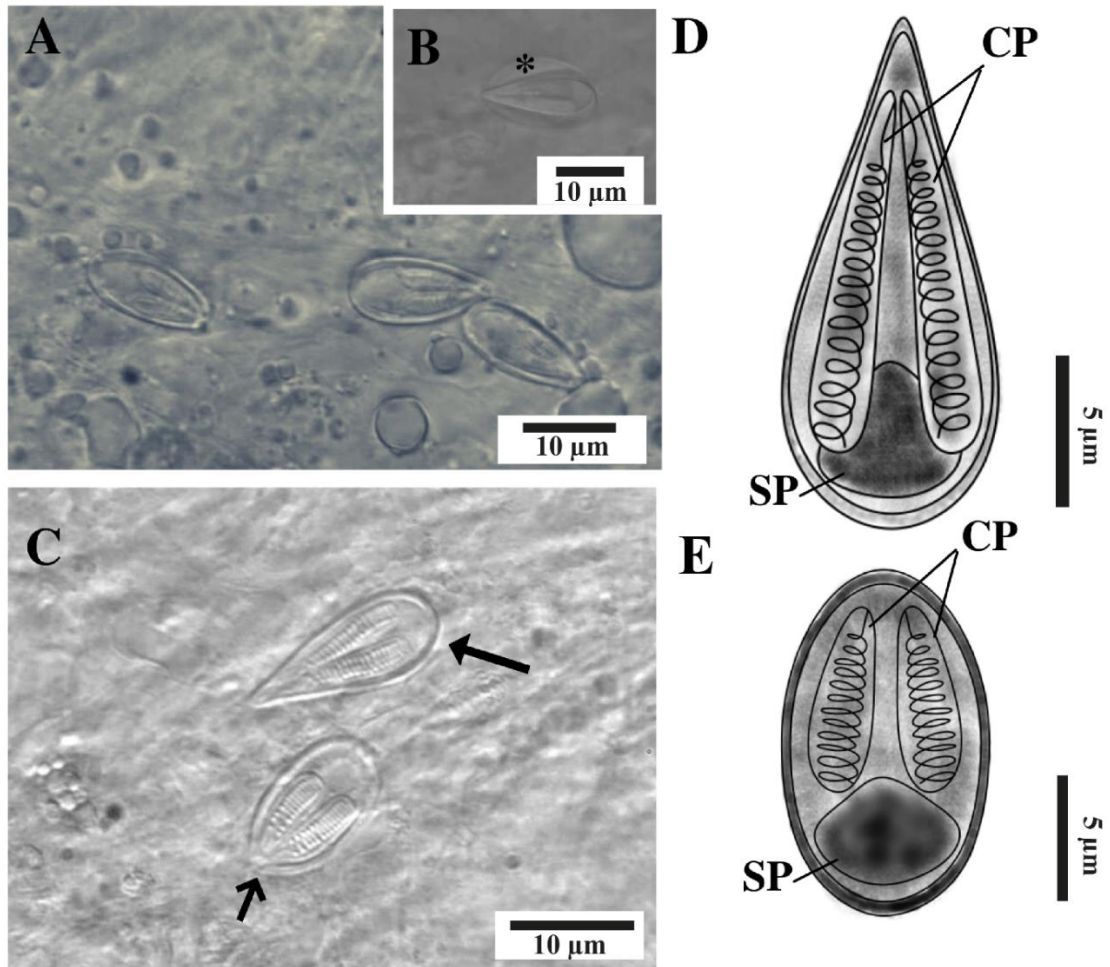
5.4 *Myxobolus* em órgãos de *M. lippincottianus*

No fígado, baço, rins e bexiga urinária em uma prevalência de 75% (45/60) dos espécimes analisados, foram observados mixosporos de *Myxobolus* sp. maduros e em fase de desenvolvimento esporogênico, envolvidos por plasmódio (Figura 26A-B). Locais de infecção múltiplos são incomuns para espécies desse gênero descritas na Amazônia, sendo que a maioria apresenta tropismo por determinado órgão/tecido do hospedeiro, exceto *M. longissimus* que foi observado no coração, estômago, intestino e arco branquial do tambaqui (*Colossoma macropomum*) (MOLNÁR; BÉKÉSI, 1993; CAPODIFOGGIO *et al.*, 2019).

A prevalência deste estudo aproximou-se de *M. insignis* em *Semaprochilodus insignis* com 75% em 2 dos 3 espécimes analisados (EIRAS *et al.*, 2005) e acima de *Myxobolus* sp. nas brânquias do tambaqui com 70% (VIDEIRA *et al.*, 2016) e *M. freitasi* no cérebro do peixe elétrico *Brachyhypopomus beebei* com 60% (SINDEAUX-NETO *et al.*, 2021). Em média a incidência de parasitos desse táxon nos peixes amazônicos é menor que 30%.

Em todos os sítios de infecção dois morfotipos de *Myxobolus* foram visualizados (Figura 26C). O *Myxobolus* sp.1 era piriforme medindo $17,2 \pm 0,8$ (16,3-17,7) μm de comprimento e $8,2 \pm 1,9$ (6,8-10,4) μm de largura, com cápsulas polares piriformes simétricas que acompanham a forma do esporo, medindo $13 \pm 0,8$ (12,4-13,6) μm de comprimento e $2,9 \pm 0,2$ (2,9-3,2) μm de largura, com filamentos polares em um intervalo de 16 a 18 voltas (Figura 26 D). Enquanto o *Myxobolus* sp.2 era menor com $13,9 \pm 0,7$ (13,1-15) μm de comprimento e $7 \pm 0,7$ (6,1-7,7) μm de largura, a morfologia era elipsoidal, com cápsulas polares sub-esféricas medindo $8,3 \pm 0,7$ (7-8,8) μm de comprimento e $2,35 \pm 0,33$ (2-2,7) μm de largura, internamente apresentavam filamentos polares de 15 a 16 voltas (Figura 26E).

Figura 26 - Fotomicrografias em DIC de *Myxobolus* sp. infectando *M. lippincottianus*. A- Mixosporos de *Myxobolus* sp. B- Presença de mixosporo maduro envolvido por um plasmódio (*). C- Indicação de dois morfotipos de mixosporos, um piriforme (seta maior) e outro elíptico (seta menor); D e E Desenhos esquemáticos de ambos morfotipos, com destaque para estruturas internas, como as cápsulas polares (CP) e o esporoplasma (SP).



A compilação dos dados morfométricos para *Myxobolus* spp. descritos na região amazônica por meio da ACP, revelou que o componente 1 foi responsável por 89% da variância das amostras, na qual *Myxobolus* sp.1 esteve mais próximo de *M. myleus*, em decorrência da proximidade no tamanho do comprimento das cápsulas polares (Figura 27). Em relação a *Myxobolus* sp.2, correlacionou-se negativamente com *M. tapajosi*, decorrente do comprimento do esporo. As espécies *M. marajoensis* e *M. braziliensis* apresentaram correlação negativa em ambos os eixos, por apresentarem dimensões estruturais semelhantes (Tabela 5).

Figura 27 - ACP dos dados morfométricos de *Myxobolus* spp. descritos na Amazônia brasileira. CE: Comprimento do Mixosporo. LE: Largura do Esporo. CCP: Comprimento das Cápsulas Polares. LCP: Largura das Cápsulas Polares.

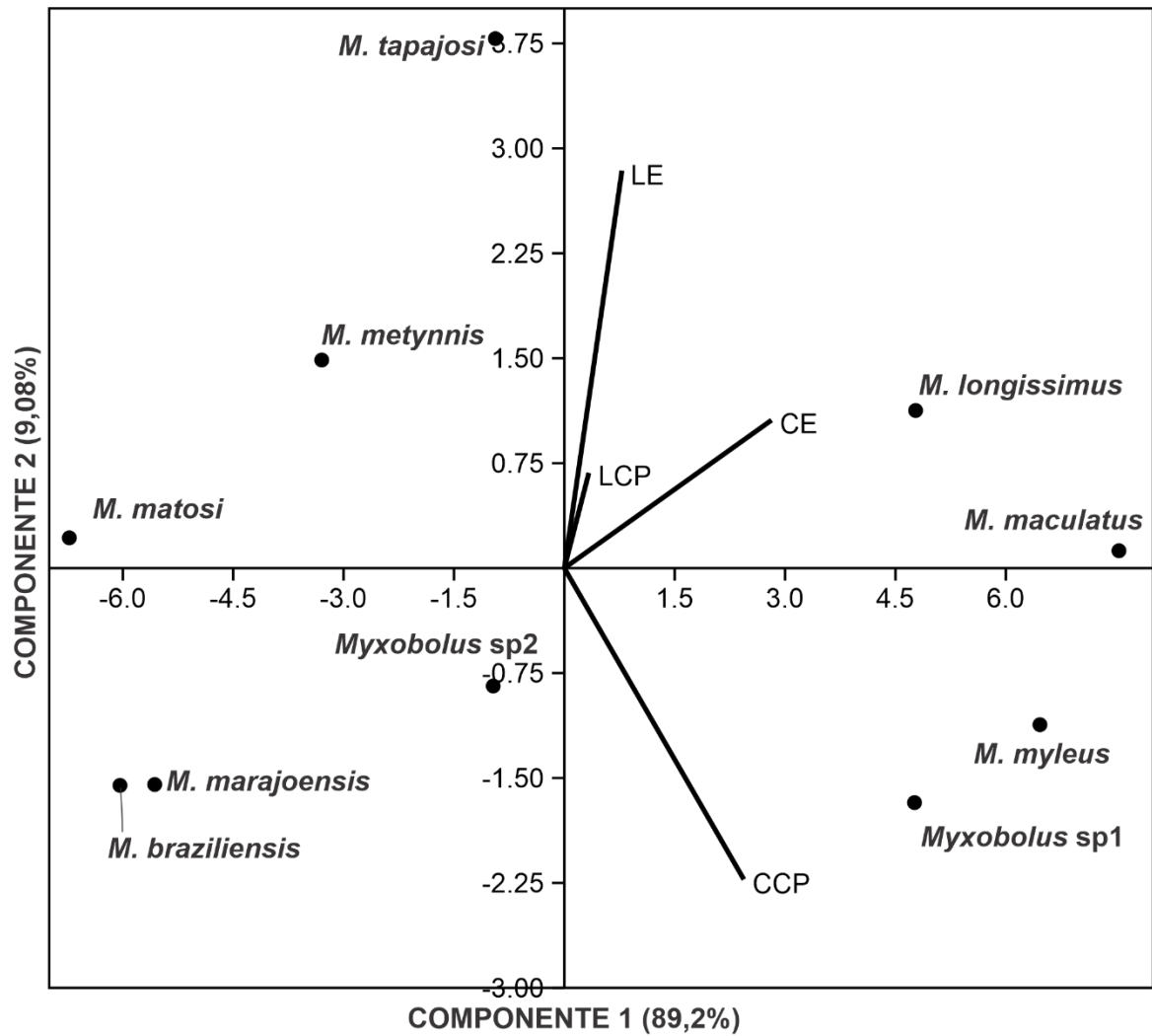
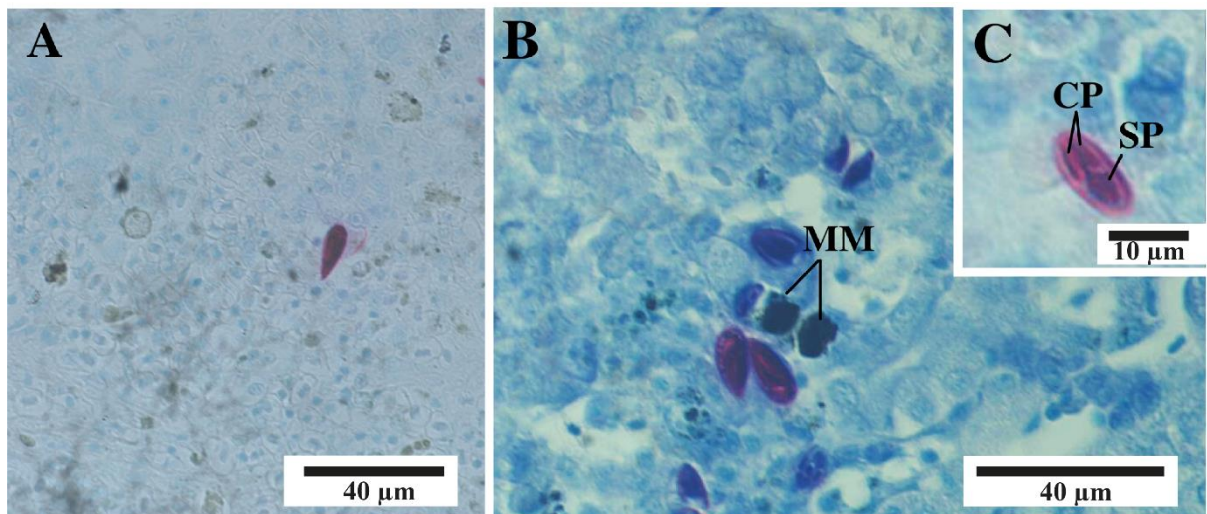


Tabela 5- Dados morfométricos (μm) de *Myxobolus* spp. em hospedeiros da Amazônia. NVFP - Número de voltas do filamento polar.

Espécie/Referência	Mixosporo		Cápsula Polar		NVFP	Hospedeiro	Local de Infecção	Localidade
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura				
<i>Myxobolus</i> sp.1 (Presente estudo)	17.2	8.2	13	2.9	16-18	<i>M. lippincottianus</i>	Rins, fígado, baço e bexiga.	Pará
<i>Myxobolus</i> sp.2 (Presente estudo)	13.9	7	8.3	2.35	15-16	<i>M. lippincottianus</i>	Rins, fígado, baço e bexiga.	Pará
<i>M. braziliensis</i> Casal <i>et al.</i> , (1996)	10.2	5.28	5.30	1.43	9-11	<i>Bunocephalus coracoideus</i>	Brânquias	Pará
<i>M. maculatus</i> Casal <i>et al.</i> , (2002)	21.0	8.9	12.7	3.2	14-15	<i>Metynnis maculatus</i>	Rins	Pará
<i>M. metynnis</i> Casal <i>et al.</i> , (2006)	13.1	7.8	5.2	3.2	8-9	<i>Metynnis argenteus</i>	Região orbicular	Pará
<i>M. myleus</i> Azevedo <i>et al.</i> , (2012)	19.3	8.3	13.2	3.0	19-21	<i>Myleus rubripinnis</i>	Bile	Pará
<i>M. marajoensis</i> Abrunhosa <i>et al.</i> , (2017)	10.9	5.1	5.3	1.6	-	<i>Rhamdia quelen</i>	Intestino	Pará
<i>M. tapajosi</i> Zatti <i>et al.</i> , (2018a)	15	10.7	5.8	3	6-7	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Brânquias	Pará
<i>M. matosi</i> Capodifoglio <i>et al.</i> , (2019)	9.6	7.0	4.3	1.9	-	<i>Colossoma macropomum</i>	Opérculo	Pará
<i>M. longissimus</i> Capodifoglio <i>et al.</i> , (2019)	19.1	9.4	10.5	2.5	9-10	<i>Colossoma macropomum</i>	Estômago	Pará
<i>Myxobolus</i> sp.3 Oliveira <i>et al.</i> , (2020)	12.5	7.3	6.2	2.8	8-10	<i>M. hypsauchen</i>	Rins	Pará

Na histologia, foi observado estágios pré-esporogênicos no baço (Figura 28A) e intertício renal próximo a corpos melanomacrofágicos (Figura 28B). Aspecto de desenvolvimento semelhante a *Tetracapsuloides bryosalmonae* em trutas, um mixozoário reponsável por causar a Doença Renal Proliferativa (PKD), onde a fase esporogênica ocorre intra-luminal (KUMAR *et al.*, 2013). Embora não sejam observadas formação císticas para *M. lippincottianus*, Oliveira *et al.*, (2020) descreveu aglomerados de *Myxobolus* sp. nos túbulos renais próximos de *Metynnis hypsauchen*. A presença de macrofágos pode estar relacionada com o transporte de mixosporos para esses órgãos por meio da fagocitose, como relatado por Yokoyama *et al.*, (1996) na infecção de *Myxobolus artus* na carpa *Cyprinus carpio*.

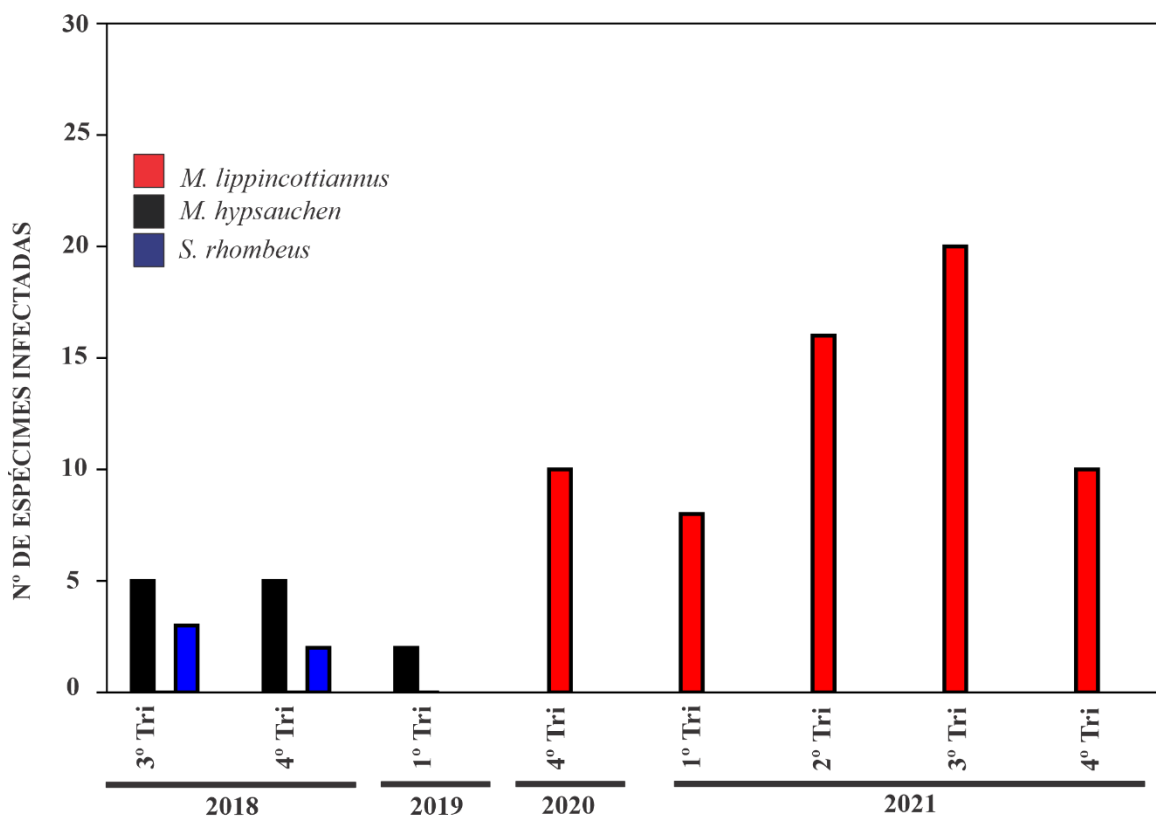
Figura 28 - Fotomicrografias de *Myxobolus* sp. infectando *M. lippincottianus* coradas em ZN. A – Esporo maduro no baço. B- Mixosporos nos intercisio renal, próximo a melanomacrofágos (MM). C- Destaque para a estrutural do esporo, com as cápsulas polares (CP) e esporoplasma (SP).



5.5 Influência da sazonalidade na carga parasitária

A prevalência de parasitismo por hospedeiro nas áreas de coleta, foram maiores no 3º e 4º trimestres para mixozoários em *M. hypsauchen* e em relação aos coccídeos em *S. rhombeus*, no entanto no 1º trimestre houve uma redução para ambas as espécies. Enquanto para *M. lippincottianus* a incidência foi maior no 2º e 3º trimestre do ano, sendo que nesse último o quantitativo de espécimes infectadas foi superior com uma diferença de 2 exemplares (Figura 29). Esses períodos no clima amazônico, correspondem ao seco (agosto a novembro) e parte do chuvoso (janeiro a junho), sendo os meses de julho e dezembro considerados transicionais (SOUZA *et al.*, 2004).

Figura 29 - Quantitativo de espécimes infectados por trimestres (Tri) anuais.



A sazonalidade é um aspecto preponderante para a presença de algumas espécies de mixozoários nos seus hospedeiros, estudos em diversas regiões do mundo tem demonstrado variações de prevalência de acordo com o clima, por exemplo, mixosporo de *Myxidium tunisiensis*, foram mais frequentes na raia *Raja radula* durante o outono na Tunísia, quando as águas estavam mais quentes (ELLOUMI *et al.*, 2021), semelhantemente *Kudoa thyrsites* também foi mais prevalente em *Sardinops sagax* nessa mesma estação do ano na África (HENNING *et al.*, 2019).

A maior presença dos mixozoários no período seco está associado com a diminuição dos níveis dos rios na Amazônia em decorrência da incidência das chuvas, que de acordo com a classificação de Köppen para a região, em alguns meses a altura pluviométrica pode ser inferior a 60 mm (BASTOS, 1972). Resultado contrário foi descrito por Azevedo *et al.*, (2013b) onde a presença de *H. nagelli* descrito no estado do Amazonas, foi observada nas brânquias de *Cyphocharax nagelii*, somente no inverno. Essas alterações pluviométricas implicam em outras variáveis físico-químicas da água, onde em ambientes estuarinos a maior ocorrência de *Kudoa* nos bagres *Cathorops spixii* e *Cathorops agassizii* adquiridos durante o verão, correlacionava-se de forma negativa com o nível de salinidade (SANTOS *et al.*, 2019).

Em relação a outros biomas do Brasil, no pantanal não foram observados alteração de prevalência significativas de acordo com a sazonalidade para os mixozoários em hospedeiros silvestres e de cativeiros (ADRIANO *et al.*, 2009; MILANIN *et al.*, 2010). Outros aspectos são mais importantes em alguns casos, como a preferência por determinado sexo do hospedeiro para algumas espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* (ADRIANO *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2018). Embora nesse estudo o clima seja a variável mais atenuante.

Ao contrário desta análise, os calyptosporídeos dispostos no hepatopâncreas de *Cichla temensis* tiveram maiores taxas de infecções no período chuvoso e os machos foram os mais acometidos (SANTIAGO *et al.*, 2012). No estudo realizado por Negrão *et al.*, (2019) relacionou a carga parasitária com o hábito alimentar do hospedeiro, sendo maiores em espécies carnívoras em detrimento dos herbívoros, incluindo *M. lippincottianus*, uma das espécies analisadas neste trabalho. Em coccídeos do gênero *Goussia* a frequência parasitária foi contínua em peixes durante todos os períodos do ano em Portugal, sendo o fígado o órgão mais acometido (XAVIER *et al.*, 2020).

6 CONCLUSÃO

As análises morfológicas dos microparasitos nos espécimes de *M. lippincottianus* permitiram a identificação de 2 táxons de mixozoários da família myxobolidade, os gêneros *Myxobolus* e *Henneguya*.

Em *M. hypsauchen* foi observado a presença somente de *Myxobolus*. Enquanto na piranha *S. rhombeus*, um táxon da sub-classe coccidia foi encontrado, o gênero *Calyptospora*. Os mixosporos de *Henneguya* sp. induziram formações císticas nas brânquias de *M. lippincottianus* em uma elevada prevalência, causando deformações nas células epiteliais. Enquanto *Myxobolus* encontrava-se no baço e interstício renal. De forma semelhante foram observados em *M. hypsauchen*, mas houveram formações císticas no túbulo renal proximal e a presença de infiltrados de células mononucleares. Em *S. rhombeus*, os coccídeos encontravam-se no parênquima hepático, alguns oocistos foram envolvidos por fibroblastos.

As divergências morfológicas com outras espécies indicaram a possibilidade de cinco novas espécies (4 mixozoários e um cococídeo), mas dados moleculares são necessários para a elucidação taxonômica sobre os novos táxons. Em ambos os locais a prevalência foi elevada no período seco e se manteve até o início do período chuvoso, correspondendo aos meses transicionais, demonstrando que o tropismo e desenvolvimento dos mixosporos dependem da sazonalidade.

REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, J. *et al.* *Myxobolus marajoensis* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae), parasite of the freshwater catfish *Rhamdia quelen* from the Brazilian Amazon region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, p. 465-471, 2017.
- ABDEL-BAKI, A. S. *et al.* Two *Myxobolus* spp. infecting the kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the River Nile at Beni-Suef governorate, Egypt, and the associated renal changes. **Parasitology research**, v. 114, n. 3, p. 1107-1112, 2015.
- ALBUQUERQUE, M. C.; BRASIL-SATO, M. C. First report of *Calyptospora* sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) in forage characid fish from the Três Marias Reservoir, São Francisco Basin, Brazil. **European journal of protistology**, v. 46, n. 2, p. 150-152, 2010.
- ADRIANO, E. A. *et al.* Prevalência, distribuição geográfica e sazonal de protozoários e mixozoários parasitos de jaú (*Zungaro jahu*) no Pantanal Matogrossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 1341-1344, 2012.
- ADRIANO, E. A. *et al.* *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: morphology, phylogeny and histopathology. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 3-4, p. 221-229, 2009.
- ADRIANO, E. A.; ARANA, S.; CORDEIRO, N. S. Histology, ultrastructure and prevalence of *Henneguya piaractus* (Myxosporea) infecting the gills of *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. **Diseases of aquatic organisms**, v. 64, n. 3, p. 229-235, 2005.
- ALBOUY, C. *et al.* A rede alimentar de peixes marinhos está globalmente conectada. **Ecologia e evolução da natureza**, v. 3, n. 8, pág. 1153-1161, 2019.
- ALLEN, M. B.; BERGERSEN, E. P. Factors influencing the distribution of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease, in the Cache la Poudre River, Colorado. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 49, n. 1, p. 51-60, 2002.
- AMERICUS, B. *et al.* A comparison of the structure and function of nematocysts in free-living and parasitic cnidarians (Myxozoa). **International Journal for Parasitology**, v.50, n.10, p.763-769, 2020.
- ANDREE, K. B. *et al.* Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bilvalvidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences. **The Journal of parasitology**, p. 68-74, 1999.
- ANDERSON, J. T.; ROJAS, J. S.; FLECKER, A. S. High-quality seed dispersal by fruit-eating fishes in Amazonian floodplain habitats. **Oecologia**, v. 161, n. 2, p. 279-290, 2009.
- AQUINO, C. M. *et al.* Diferentes parasitas em produtos de pesca: Uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v. 13, n. 2, p. 266-288, 2019.
- ATKINSON, S. D. *et al.* Approaches for characterising myxozoan species. In: OKAMURA, B.; GRUHL, A.; BARTHOLOMEW, J. L (ed.), **Myxozoan evolution, ecology and development**. Springer, Cham, 2015. p. 111-123.

ATKINSON, S. D.; BARTHOLOMEW, J. L.; LOTAN, T. Myxozoans: Ancient metazoan parasites find a home in phylum Cnidaria. **Zoology**, v. 129, p. 66-68, 2018.

AZEVEDO, C. *et al.* Light and electron microscopy of the spore of *Myxobolus heckelii* n. sp. (Myxozoa), parasite from the Brazilian fish *Centromochlus heckelii* (Teleostei, Auchenipteridae). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 589-593, 2009.

AZEVEDO, C. *et al.* Light and ultrastructural description of *Meglitschia mylei* n. sp. (Myxozoa) from *Myleus rubripinnis* (Teleostei: Serrasalminidae) in the Amazon River system. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 525-528, 2011a.

AZEVEDO, C. *et al.* Ultrastructure of *Myxobolus brycon* n. sp. (Phylum Myxozoa), parasite of the piraputanga fish *Brycon hilarii* (Teleostei) from Pantanal (Brazil). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 88-93, 2011b.

AZEVEDO, C. *et al.* *Myxobolus myleus* n. sp. infecting the bile of the Amazonian freshwater fish *Myleus rubripinnis* (Teleostei: Serrasalminidae): morphology and pathology. **Systematic parasitology**, v. 82, n. 3, p. 241-247, 2012.

AZEVEDO, C. *et al.* Ultrastructural description of *Ceratomyxa microlepis* sp. nov. (Phylum Myxozoa): a parasite infecting the gall bladder of *Hemiodus microlepis*, a freshwater teleost from the Amazon River. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 2, p. 150-154, 2013 a.

AZEVEDO, R. K. *et al.* *Henneguya nagelii* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) in *Cyphocharax nagelii* (Steindachner, 1881) (Teleostei: Characiformes: Curimatidae) from the Peixe's River, São Paulo State, Brazil. **Parasitology research**, v. 112, n. 10, p. 3601-3605, 2013b.

AZEVEDO, C.; MATOS, E. *Henneguya malabarica* sp. nov. (Myxozoa, Myxobolidae) in the Amazonian fish *Hoplias malabaricus*. **Parasitology research**, v. 82, n. 3, p. 222-224, 1996.

AZEVEDO, C.; MATOS, E.; MATOS, P. Ultrastructural data on sporogony of the coccidian parasite *Calyptospora spinosa* from the liver of the Amazonian fish, *Crenicichla lepidota* Heckel. **Journal of Fish Diseases**, v. 18, n. 6, p. 475-479, 1995.

AZEVEDO, C.; MATOS, P.; MATOS, E. Morphological data of *Calyptospora spinosa* n. sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) parasite of *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 (Teleostei) from Amazon River. **European journal of protistology**, v. 29, n. 2, p. 171-175, 1993.

AZEVEDO, R. K. *et al.* Morphological and molecular analysis of *Henneguya lagunensis* n. sp. (Cnidaria, Myxosporidia) parasitizing the gills of *Eugerres brasiliensis* from Brazil. **Parasitology International**, v. 80, p. 102184, 2021.

BATUEVA, M. D-D. Morphological, histological, and molecular aspects of *Myxobolus zaikae* n. sp., a parasite of the roach *Rutilus rutilus*, in Lake Baikal. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 142, p. 75-82, 2020.

BARASSA, B.; CORDEIRO, N. S.; ARANA, S. A new species of *Henneguya*, a gill parasite of *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae) from Brazil, with comments on histopathology and seasonality. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 761-765, 2003.

BARBER, I.; HOARE, D.; KRAUSE, J. Effects of parasites on fish behaviour: a review and evolutionary perspective. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, n. 2, p. 131-165, 2000.

BARTHOLOMEW, J. L. *et al.* Myxozoan parasitism in waterfowl. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 10, p. 1199-1207, 2008.

BASTOS, T.X. O clima da Amazônia brasileira segundo Koppen. Belém, IPEAN. **B. Técnico**, v.54, p.68-122, 1972.

BÉKÉSI, L.; MOLNÁR, K. *Calyptospora tucunarensis* n. sp. (Apicomplexa: Sporozoea) from the liver of tucunare *Cichla ocellaris* in Brazil. **Systematic parasitology**, v. 18, n. 2, p. 127-132, 1991.

BELLAY, S. *et al.* Ectoparasites are more vulnerable to host extinction than co-occurring endoparasites: evidence from metazoan parasites of freshwater and marine fishes. *Hydrobiologia*, v. 847, n. 13, p. 2873-2882, 2020.

BONAR, C. J. *et al.* Hepatic *Calyptospora* sp. (Apicomplexa) infection in a wild-born, aquarium-held clutch of juvenile arapaima *Arapaima gigas* (Osteoglossidae). **Diseases of aquatic organisms**, v. 70, n. 1-2, p. 81-92, 2006.

BOREHAM, R. E. *et al.* Incidental finding of *Myxobolus* spores (Protozoa: Myxozoa) in stool samples from patients with gastrointestinal symptoms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3728-3730, 1998.

BOWMAN, D.D. *et al.* **Parasitologia Veterinária de Georgis**. São Paulo, Manole, 2006. 60p.

BRABO, M. F. *et al.* Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura/Current scenario of fish production in the world, Brazil and Pará State: emphasis on aquaculture. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 4, n. 2, p. 50-58, 2016.

BUSH, A. O. *et al.* Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 4, p. 557-583. 1997.

BUSH, A. O. *et al.* **Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites**. Cambridge university press, 2001.

CANAN, B.; GURGEL, H. C. B. Ritmicidade da alimentação e dieta de *Metynnis roosevelti* Eigenmann (Characidae, Myleinae) da Lagoa do Jiqui, Parnamirim, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revta bras. Zool**, v. 19, n. 2, p. 309-630, 2002.

CANNING, E. U. *et al.* Biodiversity and evolution of the Myxozoa. **Advances in Parasitology**, v. 56, n. 56, p. 43-131, 2004.

CAPODIFOGGIO, K. RH. *et al.* The resolution of the taxonomic dilemma of *Myxobolus colossomatis* and description of two novel myxosporeans species of *Colossoma macropomum* from Amazon basin. **Acta tropica**, v. 191, p. 17-23, 2019.

CAPODIFOGGIO, K. RH. *et al.* Morphological, ultrastructural and phylogenetic analyses of *Myxobolus hilarii* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), a renal parasite of farmed *Brycon hilarii* in Brazil. **Parasitology international**, v. 65, n. 3, p. 184-190, 2016.

CARDOSO, D. C. *et al.* Diet and ecomorphology of predator fish species of the Amazonian floodplain lakes. **Biota Neotropica**, v. 19, n. 3, 2019.

CARVALHO, H. R. L. *et al.* Aquaculture in the Guamá micro-region, State of Pará, Eastern Amazon, Brazil. *Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, v. 56, n. 1, p. 1-6, 2013.

CARVALHO, A. A. *et al.* Infection of *Henneguya* sp. on the gills of *Metynnis lippincottianus* from Curiaú River, in eastern Amazon region (Brazil). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 3, 2020.

CARRIERO, M. M. *et al.* Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e73713, 2013.

CASAL, G.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. A new myxozoan parasite from the Amazonian fish *Metynnis argenteus* (Teleostei, Characidae): light and electron microscope observations. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 817-821, 2006.

CASAL, G.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. Ultrastructural data on the life cycle stages of *Myxobolus braziliensis* n. sp., parasite of an Amazonian fish. **European Journal of Protistology**, v. 32, n. 1, p. 123-127, 1996.

CASAL, G.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. Ultrastructural data on the spore of *Myxobolus maculatus* n. sp. (phylum Myxozoa), parasite from the Amazonian fish *Metynnis maculatus* (Teleostei). **Diseases of aquatic organisms**, v. 51, n. 2, p. 107-112, 2002.

CASAL, G.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. Light and electron microscopic study of the myxosporean, *Henneguya friderici* n. sp. from the Amazonian teleostean fish, *Leporinus friderici*. **Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 313-319, 2003.

CASAL G. *et al.* Morphological and ultrastructural redescription of *Calyptospora serrasalmi* Cheung, Nigrelli & Ruggieri, 1986 (Apicomplexa: Calyptosporidae), a parasite found in two new host species of the genus *Serrasalmus*. **Brazilian journal of morphological**. v. 101, n.1, p. 11-16, 2007.

CECH, G.; MOLNÁR, K.; SZÉKELY, C. Molecular genetic studies on morphologically indistinguishable *Myxobolus* spp. infecting cyprinid fishes, with the description of three new species, *M. alvarezae* sp. nov., *M. sitjæ* sp. nov. and *M. eirasianus* sp. nov. **Acta parasitologica**, v. 57, n. 4, p. 354-366, 2012.

CHAUDHARY, A. *et al.* Morphological, histological, and molecular description of *Myxobolus ompok* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae), a kidney myxozoan from Pabdah catfish *Ompok pabda* (Hamilton, 1822) (Siluriformes: Siluridae) in India. **Parasitology research**, v. 117, n. 6, p. 1899-1905, 2018.

CHANG, E. S. *et al.* Genomic insights into the evolutionary origin of Myxozoa within Cnidaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 48, p. 14912-14917, 2015.

CHEUNG, P. J.; NIGRELLI, R. F., RUGGIERI, G. D. *Calyptospora serrasalmi* sp. nov. (Coccidia: Calyptosporidae) from liver of the black piranha, *Serrasalmus niger* Schomburgk. **J Aquaricult Aquat Sci**, 1986. v.4, n. 3, p. 54-57.

CLARENCE, A. S. The coccidia. *In*: JENSON, p (ed). **In Vitro Cultivation Of Protozoan Parasites**, 2019.

DALLAS, T.; CORNELIUS, E. Co-extinction in a host-parasite network: identifying key hosts for network stability. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2015.

DA SILVA, M. F. *et al.* Morphology and phylogeny of *Calyptospora paranaidji* n. sp.(Eimeriorina: Calyptosporidae), an apicomplexan parasite of the hepatic tissue of *Cichla piquiti* Kullander & Ferreira, 2006, from a reservoir in the Brazilian Amazon region. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 608-616, 2019.

DELAUNOIS, Y. *et al.* Microstructural and compositional variation in pacu and piranha teeth related to diet specialization (Teleostei: Serrasalminidae). **Journal of structural biology**, v. 210, n. 3, p. 107509, 2020.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2 ed. CRC press, 2016. 336p.

EIRAS, J. C. *et al.* *Myxobolus insignis* sp. n.(Myxozoa, Myxosporea, Myxobolidae), a parasite of the Amazonian teleost fish *Semaprochilodus insignis* (Osteichthyes, Prochilodontidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 245-247, 2005.

EIRAS, J. C.; ADRIANO, E. A. A checklist of new species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2002 and 2012. **Systematic Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 95-104, 2012.

ELLOUMI, A. *et al.* *Myxidium tunisiensis* n. sp. (Myxosporea: Myxidiidae) infecting the rough skate *Raja radula* Delaroche, 1908 (Rajiformes: Rajidae) from North East Tunisia. **Parasitology Research**, p. 1-15, 2021.

ESPINOZA, L. L. *et al.* A new *Myxidium* species (Myxozoa: Myxosporea) infecting the gallbladder of the turtle *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemididae) from Peruvian Amazon. **Acta Tropica**, v. 172, p. 75-79, 2017.

FARRELL, M. J. *et al.* The path to host extinction can lead to loss of generalist parasites. **Journal of Animal Ecology**, v. 84, n. 4, p. 978-984, 2015.

FEIST, S. W.; LONGSHAW, M. Phylum myxozoa. **Fish diseases and disorders**, v. 1, p. 230-296, 2006.

FERREIRA, E. JG; ZUANON, J.; SANTOS, G. M. A list of commercial fish species from Santarém, State of Pará, Brazil. **Naga, the ICLARM Quarterly**, v. 19, n. 3, p. 41-44, 1996.

FERREIRA, R. L. S. *et al.* *Henneguya sacacaensis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) parasitizing gills of the acará bicudo *Satanoperca jurupari* (Osteichthyes: Cichlidae) in eastern Amazon. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, 2020.

FIALA, I. The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 14, p. 1521-1534, 2006.

FIGUEREDO, R. T. A. *et al.* Henneguyosis in gills of *Metynnis hypsauchen*: an Amazon freshwater fish. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 44, n. 1, p. 213-220, 2020.

FOOX, J.; SIDDALL, M. E. The road to Cnidaria: history of phylogeny of the Myxozoa. **Journal of Parasitology**, v. 101, n. 3, p. 269-274, 2015.

FRÉNAL, K. *et al.* Gliding motility powers invasion and egress in Apicomplexa. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 645, 2017.

GALVÃO, A. L. B. *et al.* Importância da criptosporidiose como zoonose. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n. 2, 2012.

GLEICHNER, A. M., CLEVELAND, J. A., MINCHELLA, D. J. One stimulus - Two responses: Host and parasite life history variation in response to environmental stress. **Evolution**, v. 70, n. 11, p. 2640-2646, 2016.

GOULDING, M. *The Fishes and the Forest: Explorations in Amazonian Natural History*. 1. Ed. Califórnia: Univ of California, 1980. 280 p.

GOULDING, M.; CARVALHO, M. L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 2, p. 107-133, 1982.

HARTIGAN, A. *et al.* Recruitment of toxin-like proteins with ancestral venom function supports endoparasitic lifestyles of Myxozoa. **PeerJ**, v. 9, p. e11208, 2021.

HALLETT, S. L.; DIAMANT, A. 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**, v. 46, n. 3, p. 197-212, 2001.

HALLETT, S. L. *et al.* Myxozoans exploiting homeotherms. *In*: OKAMURA, B.; GRUHL, A.; BARTHOLOMEW, J. L (ed.). **Myxozoan Evolution, Ecology and Development**. Springer, Cham, 2015. p. 125-135.

HAAPARANTA, A.; TELLERVO VALTONEN, E.; HOFFMANN, R. W. Pathogenicity and seasonal occurrence of *Henneguya creplini* (Protozoa, Myxosporea) on the gills of perch *Perca fluviatilis* in central Finland. **Diseases of aquatic organisms**, v. 20, n. 1, p. 15-22, 1994.

HAMMER, O.; HARPER, D. AT; RYAN, P. D. Palaeontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 2001.

HENNING, S. S.; KRÜGEL, M.; MANLEY, M. Prevalence of *Kudoa thyrsites* (Myxozoa) in South African sardine *Sardinops sagax*, kingklip *Genypterus capensis*, and Cape hakes *Merluccius capensis* and *M. paradoxus*. **African Journal of Marine Science**, v. 41, n. 3, p. 261-268, 2019.

HOFFMAN, G. L. *Myxobolus cerebralis*, a worldwide cause of salmonid whirling disease. **Journal of Aquatic Animal Health**, [s. l], v. 2, n. 1, p. 30-37, 1990.

ISAAC, V. J. *et al.* Uma avaliação interdisciplinar dos sistemas de produção pesqueira do estado do Pará, Brasil. In: HAIMOVICI, M. (org.). **Sistemas pesqueiros marinhos e estuarinos do Brasil: caracterização e análise da sustentabilidade**. Rio Grande: UFRS, 2011. p.11-24.

ITIS, Integrated Taxonomic Information System. Disponível em: <<https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt#null>> Acesso em: 02 de Fev. de 2021.

JÉGU, M. Serrasalminae (Pacus and piranhas) In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARI Jr., C. J. (Ed.) **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 182-196.

JÉZÉQUEL, C. *et al.* A database of freshwater fish species of the Amazon Basin. **Scientific data**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2020a.

JÉZÉQUEL, C. *et al.* Freshwater fish diversity hotspots for conservation priorities in the Amazon Basin. **Conservation biology**, v.0, n. 0, p. 1-10 2020b.

JUNIOR, A. C. S. S. Myxosporidiose em peixes de água doce. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 2, n. 2, p. 25-39, 2014.

KAWAI, T. *et al.* 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**, v. 54, n.8, p.1046-1052.

KSEPKA, S. P.; BULLARD, S. A. Two new species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Cnidaria: Bivalvulida: Myxobolidae) infecting the gill of the black redhorse, *Moxostoma duquesnei* (Lesueur)(Cypriniformes: Catostomidae) in the Little Tennessee River Basin, North Carolina. **Systematic Parasitology**, v. 98, n. 5, p. 713-730, 2021

KENT, M. L. *et al.* Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 395-413, 2001.

KIRCHNER, R. M. *et al.* Análise da produção e comercialização do pescado no Brasil. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 10, n. 2, p. 168-177, 2016.

KLIMPEL, S. *et al.* Parasitic Groups. In: KLIMPEL, S.; KUHN, T.; MÜNSTER, J.; DÖRGE, D.D; KLAPPER, R.; KOCHMANN, J. **Parasites of Marine Fish and Cephalopods**. Springer, Cham, 2019. p. 29-76.

KOCH, T. L.; HAUSER, F.; GRIMMELIKHUIJZEN, C. JP. An evolutionary genomics view on neuropeptide genes in Hydrozoa and Endocnidozoa (Myxozoa). **BMC genomics**, v. 22, n. 1, p. 1-22, 2021.

KOLMANN, M. A. *et al.* Phylogenomics of piranhas and pacus (Serrasalminae) uncovers how dietary convergence and parallelism obfuscate traditional morphological taxonomy. **Systematic Biology**, 2020.

KUMAR, G. *et al.* Fate of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) after infection of brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Diseases of aquatic organisms**, v. 107, n. 1, p. 9-18, 2013.

KWASEK, K.; THORNE-LYMAN, A. L.; PHILLIPS, M. Can human nutrition be improved through better fish feeding practices? a review paper. **Critical reviews in food science and nutrition**, p. 1-14, 2020.

LÁSZLÓ, B.; CSABA, S.; KÁLMÁN, M. Atuais conhecimentos sobre Myxosporea (Myxozoa), parasitas de peixes: um estágio alternativo dos parasitas no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 271-276, 2002.

LEVÊQUE, C. *et al.* Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *In*: BALIAN, EV; SEGERS, H.; MARTENS, K.; LÉVÉQUE, C (org.). **Freshwater animal diversity assessment**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 545-567.

LEVINE, N. D. Uniform terminology for the protozoan subphylum Apicomplexa. **The Journal of Protozoology**, v. 18, n. 2, p. 352-355, 1971.

LOM, J. *et al.* Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. **Folia parasitologica**, v. 53, n. 1, p. 1-36, 2006.

LOM, J.; ARTHUR, J. R. A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. **Journal of Parasite Diseases**, v.12, n.2, p. 151-156.

LOM, J.; DYKOVÁ, I. Myxosporidia (Phylum Myxozoa). **Protozoan parasites of fishes. Developments in aquaculture and fisheries science**, v. 26, p. 159-235, 1992.

LOM, J.; DYKOVA, I. Ultrastructural features of the actinosporean phase of Myxosporea (phylum Myxozoa): a comparative study. **Acta Protozoologica**, v. 36, p. 83-104, 1997.

LUNA L. G. 1968. **Manual of Histologic Staining of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3. ed. McGraw-Hill, New York, p.258.

LUQUE, J. L. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. *In*: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, Ouro Preto, 2004. **Resumos** [...] Ouro Preto: Revista Brasileira de Parasitologia, v.13, 2004.

MANRIQUE, W. G. *et al.* *Myxobolus* sp. and *Henneguya* sp. (Cnidaria: Myxobolidae) natural co-infection in the kidney of *Piaractus mesopotamicus* (Characiformes: Serrasalminae). **Parasitology research**, v. 116, n. 10, p. 2853-2860, 2017.

MAFTUCH, M. *et al.* Histopathology of gill, muscle, intestine, kidney, and liver on *Myxobolus* sp. infected Koi carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of parasitic diseases**, v. 42, n. 1, p. 137-143, 2018.

MACHADO, M. H.; PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M. Introdução ao estudo dos parasitas de peixes. Apostila. Universidade Estadual de Maringá: Nupélia, 1996.

- MACHADO, V. N. *et al.* One thousand DNA barcodes of piranhas and pacus reveal geographic structure and unrecognised diversity in the Amazon. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.
- MALTA, J. C. O. Os peixes de um lago de várzea da Amazônia Central (Lago Janauacá, Rio Solimões) e suas relações com os crustáceos ectoparasitas (Branchiura: Argulidae). **Acta Amazonica**, v. 14, n. 3-4, p. 355-372, 1984.
- MARGARIDO, Y. M. *et al.* Morphological, molecular, and histopathological characterization of a new species of *Henneguya* infecting farmed *Astyanax lacustris* in Brazil. **Microbial Pathogenesis**, v. 158, p. 104991, 2021.
- MARTINS, M. *et al.* *Henneguya* sp. (Myxozoa: Myxobolidae) em *Pimelodus maculatus* (Osteichthyes: Siluridae) do Reservatório de Volta Grande, Minas Gerais, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30, n. 1, p. 01-07, 2018.
- MATHEWS, P. D. *et al.* Taxonomy and 18S rDNA-based phylogeny of *Henneguya multiradiatus* n. sp. (Cnidaria: Myxobolidae) a parasite of *Brochis multiradiatus* from Peruvian Amazon. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 104372, 2020.
- MATHEWS, P. D.; MAIA, A. AM; ADRIANO, E. A. Morphological and ultrastructural aspects of *Myxobolus niger* n. sp. (Myxozoa) gill parasite of *Corydoras melini* (Siluriformes: Callichthyidae) from Brazilian Amazon. **Acta Tropica**, v. 158, p. 214-219, 2016.
- MATOS, E. *et al.* Infection of the heart of *Pimelodus ornatus* (Teleostei, Pimelodidae), by *Myxobolus* sp. (Myxozoa, Myxobolidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 4, p. 543-546, 2014.
- MATOS, E. R. *et al.* Incidência de parasitas do Phylum Myxozoa (Sub-reino Protozoa) em peixes da região amazônica, com especial destaque para o gênero *Henneguya*. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, n. 36, p. 83-99, 2001.
- MATOS, E.; TAJDARI, J.; AZEVEDO, C. Ultrastructural studies of *Henneguya rhamdia* n. sp. (Myxozoa) a parasite from the Amazon teleost fish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 532-537, 2005.
- MCCLELLAND, R. S.; MURPHY, D. M.; CONE, D. K. Report of spores of *Henneguya salminicola* (Myxozoa) in human stool specimens: possible source of confusion with human spermatozoa. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2815-2818, 1997.
- MÉLOTTE, G. *et al.* Origin and evolution of sound production in Serrasalminidae. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 128, n. 2, p. 403-414, 2019.
- MILANIN, T. *et al.* Phylogeny, ultrastructure, histopathology and prevalence of *Myxobolus oliveirai* sp. nov., a parasite of *Brycon hilarii* (Characidae) in the Pantanal wetland, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 762-769, 2010.
- MOLNÁR, K. Site preference of fish myxosporeans in the gill. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 48, n. 3, p. 197-207, 2002.

MOLNÁR, K. Site preference of myxozoans in the kidneys of Hungarian fishes. **Diseases of aquatic organisms**, v. 78, n. 1, p. 45-53, 2007.

MOLNÁR, K. *et al.* *Myxobolus erythrophthalmi* sp. n. and *Myxobolus shaharomae* sp. n. (Myxozoa: Myxobolidae) from the internal organs of rudd, *Scardinius erythrophthalmus* (L.), and bleak, *Alburnus alburnus* (L.). **Journal of fish diseases**, v. 32, n. 3, p. 219-231, 2009.

MOLNÁR, K.; BÉKÉSI, L. Description of a new *Myxobolus* species, *M. colossomatis* n. sp. from the teleost *Colossoma macropomum* of the Amazon River basin. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 9, n. 1, p. 57-63, 1993.

NALDONI, J. *et al.* New myxosporeans parasitizing *Phractocephalus hemioliopus* from Brazil: morphology, ultrastructure and SSU-rDNA sequencing. **Diseases of aquatic organisms**, v. 128, n. 1, p. 37-49, 2018.

NEGRÃO, M. C. *et al.* Prevalence and molecular characterisation of *Calyptospora* parasites Overstreet, Hawkins and Fournié, 1984 (Apicomplexa: Calyptosporidae) in fishes from the eastern Amazon, Brazil. **Parasitology international**, v. 73, p. 101975, 2019.

OKAMURA, B.; GRUHL, A.; BARTHOLOMEW, J. L. An introduction to myxozoan evolution, ecology and development. *In: Myxozoan evolution, ecology and development.* Springer, Cham, 2015. p. 1-20.

OKAMURA, B.; HARTIGAN, A.; NALDONI, J. Extensive uncharted biodiversity: the parasite dimension. **Integrative and comparative biology**, [s. l], v. 58, n. 6, p. 1132-1145, 2018.

OLIVEIRA, J. C. *et al.* *Kudoa* spp. (Myxozoa) infection in musculature of *Plagioscion squamosissimus* (Sciaenidae) in the Amazon region, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 2, p. 235-240, 2015.

OLIVEIRA, J. E. F. *et al.* Renal myxoboliosis of *Metynnis hypsauchen* in the Brazilian Amazon: morphological and histopathological aspects. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 42, p. e50267-e50267, 2020.

OLIVEIRA, J. E. F. *et al.* Hepatic coccidiosis in *Serrasalmus rhombeus* Linnaeus, 1766 from the Amazon basin: morphological and histopathological aspects. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, 2021.

ORTÍ, G. *et al.* Phylogeny of the Serrasalmidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 343-351, 2008.

OTA, R. P. **Revisão taxonômica e filogenia morfológica de *Metynnis* Cope, 1878 (Characiformes: Serrasalmidae)**. Orientador: Lúcia Helena Rapp PyDaniel. 2015. 475 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia. Manaus, 2015.

OGAWA, K. *et al.* Histological studies on the host response to *Myxobolus artus* Akhmerov, 1960 (Myxozoa: Myxobolidae) infection in the skeletal muscle of carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, v. 41, n. 3, p. 363-371, 1992.

OVERSTREET, R. M.; HAWKINS, W. E.; FOURNIE, J. W. The Coccidian Genus *Calyptospora* ng and Family Calyptosporidae n. fam. (Apicomplexa), with Members Infecting Primarily Fishes 1. **The Journal of protozoology**, v. 31, n. 2, p. 332-339, 1984.

PAVANELLI, G. C., EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes, diagnóstico, profilaxia e tratamento**. Maringá: Euem, 2002. 305 p.

REIS, L. L. *et al.* Primeiro relato de Myxosporeo de *Myxobolus* (Cnidaria: Myxozoa) em fezes humanas no Brasil. **Acta Amazonica** , v. 49, n. 2, p. 162-165, 2019.

REIS, R. M. *et al.* Length-weight relationships and condition factor of the predatory fish, *Cichla pleiozona* and *Serrasalmus rhombeus*, from two tropical reservoirs, Amazon basin, Brazil. **Internat. J. of Fisheries and Aquatic Studies**, v.8 n. 3, p. 355-360, 2020.

RIBEIRO, L. B.; MATOSO, D. A.; FELDBERG, E. Chromosome mapping of repetitive sequences in four Serrasalmidae species (Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 46-53, 2014.

RICKLEFS, R. E. **A Economia da Natureza**. 9 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2011. 636 p.

ROCHA, E.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. *Henneguya amazonica* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae), parasitizing the gills of *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 (Teleostei, Cichlidae) from Amazon River. **European journal of protistology**, v. 28, n. 3, p. 273-278, 1992.

ROCHA, S. *et al.* Involvement of sphaeractinomaxon in the life cycle of mugiliform-infecting *Myxobolus* (Cnidaria, Myxosporea) reveals high functionality of actinospore morphotype in promoting transmission. **Parasitology**, p. 1-10, 2020.

SANTIAGO, H. *et al.* 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**, v. 110, n. 6, p. 2569-2572, 2012.

SANTOS, G. M., FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. **Peixes comerciais de Manaus**. 2.ed. Manaus: INPA, p.146, 2009.

SANTOS, J. L. F. *et al.* Seasonal patterns of infection by *Kudoa* sp. (Myxozoa) in the catfishes in the Brazilian Amazon Region. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 45, n. 2, 2019.

SÁ-OLIVEIRA, J. C. *et al.* Resource Partitioning between Two Piranhas (*Serrasalmus gibbus* and *Serrasalmus rhombeus*) in an Amazonian Reservoir. **The Scientific World Journal**, v. 2017, 2017.

SARTORI, A. G. O.; AMANCIO, R. D. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. **Segurança alimentar e nutricional**, v. 19, n. 2, p. 83-93, 2012.

SCHOLZ, T. Parasitas em peixes cultivados e selvagens. **Parasitologia veterinária** , v. 84, n. 3-4, pág. 317-335, 1999.

SHELLIS, R. P.; MILES, A. E. W. Observations with the electron microscope on enameloid formation in the common eel (*Anguilla anguilla*; Teleostei). **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 194, n. 1115, p. 253-269, 1976.

SIDDALL, M. E. *et al.* The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic Cnidaria. **The Journal of parasitology**, p. 961-967, 1995.

SILVA, M. C. *et al.* *Calyptospora* sp. in *Brachyplatystoma vaillantii* trapped at the Vigia, State of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 2, p. 176-178, 2012.

SILVA, M. F. *et al.* *Myxobolus* sp. (Myxozoa; Myxosporea) causing asymptomatic parasitic gill disease in *Astyanax aff. bimaculatus* (Characiformes; Characidae) in the Tocantins river basin, amazon region, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 4, p. 739-743, 2019.

SILVA, F. N. L. *et al.* Challenges in the aquaculture production chain in Curralinho, Marajó archipelago, Pará, Brazil/Desafios na cadeia produtiva da aquicultura em Curralinho, arquipélago do Marajó, Pará, Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 27598-27617, 2020a.

SILVA, M. F. *et al.* Hepatic coccidiosis in *Triporthesus angulatus* Spix & Agassiz, 1829 (Characiformes: Triporthesidae), a tropical fish from the eastern Brazilian Amazon, with the description of a new species of *Calyptospora* (Apicomplexa: Calyptosporidae). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 352-358, 2020b.

SINDEAUX-NETO, J. L. *et al.* Lymphocytic meningoencephalomyelitis associated with *Myxobolus* sp. (Bivalvulidae: Myxozoa) infection in the Amazonian fish *Eigenmannia* sp. (Sternopygidae: Gymnotiformes). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 158-162, 2016.

SINDEAUX-NETO, J. L. *et al.* Infecção por *Kudoa orbicularis* (Myxozoa: Multivalvulidae) na musculatura de *Chaetobranchopsis orbicularis* Steindachner, 1875, oriundo da Ilha de Marajó na região Amazônica do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1601-1606, 2017.

SINDEAUX-NETO, J. L. *et al.* *Myxobolus freitasi* n. sp. (Myxozoa: Bivalvulida), parasita do cérebro do peixe-faca elétrico na Amazônia brasileira. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, n. 1, 2021.

SMOTHERS, J. F. *et al.* Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. **Science**, v. 265, n. 5179, p. 1719-1721, 1994.

SNOW, R. W. *et al.* The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 434, n. 7030, p. 214-217, 2005.

SOUZA, E. B.; KAYANO, M. T.; AMBRIZZI, T. The regional precipitation over the eastern Amazon/northeast Brazil modulated by tropical Pacific and Atlantic SST anomalies on weekly timescale. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 19, n. 2, p. 113-122, 2004.

- STILWELL, J. M. *et al.* Necroulcerative dermatitis associated with *Myxobolus dermatoulcerans* n. sp. (Cnidaria: Myxobolidae) in red-bellied piranha, *Pygocentrus nattereri* Kner (Characiformes: Serrasalminidae), from Peru. **Systematic Parasitology**, v. 97, n. 6, p. 649-659, 2020.
- SURES, B. *et al.* Parasite responses to pollution: what we know and where we go in 'Environmental Parasitology'. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 65, 2017.
- TAJDARI, J. *et al.* Ultrastructural morphology of *Myxobolus testicularis* sp. n., parasite of the testis of *Hemiodopsis microlepis* (Teleostei: Hemiodontidae) from the NE of Brazil. **Acta Protozoologica**, v. 44, n. 4, p. 377, 2005.
- TACON, A. G. J.; METIAN, M. Fish matters: importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. **Reviews in fisheries Science**, v. 21, n. 1, p. 22-38, 2013.
- TAVECHIO, W. L. G.; GUIDELLI, G.; PORTZ, L. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 2, p. 335-341, 2018.
- THATCHER, V. E. **Amazon fish parasites**. 2^a ed. Sofia-Moscow: Pensoft. 2006. 508p.
- THATCHER, V. E. Patologia de peixes da Amazônia Brasileira, 1. Aspectos gerais. **Acta Amazonica**, v. 11, n. 1, p. 125-140, 1981.
- THOMPSON, A. W. *et al.* A time-calibrated, multi-locus phylogeny of piranhas and pacus (Characiformes: Serrasalminidae) and a comparison of species tree methods. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 81, p. 242-257, 2014.
- TIDWELL, J. H.; ALLAN, G. L. Peixes como alimento: a contribuição da aquicultura. **Relatórios EMBO**, v. 2, n. 11, p. 958-963, 2001.
- TIMI, J. T.; POULIN, R. Why ignoring parasites in fish ecology is a mistake. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 10, p.755-761, 2020.
- TOPS, S.; CURRY, A.; OKAMURA, B. Diversity and systematics of the Malacosporea (Myxozoa). **Invertebrate Biology**, v. 124, n. 4, p. 285-295, 2005.
- VEGA, G. C.; WIENS, J. J. Why are there so few fish in the sea?. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1737, p. 2323-2329, 2012.
- VELASCO, M. *et al.* Morfologia e nova ocorrência de um coccídio hepatopancreático parasita de peixe amazônico. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 55, n. 3, p. 231-235, 2012.
- VELASCO, M. *et al.* *Henneguya paraensis* n. sp.(Myxozoa; Myxosporea), a new gill parasite of the Amazonian fish *Cichla temensis* (Teleostei: Cichlidae): morphological and molecular aspects. **Parasitology research**, v. 115, n. 5, p. 1779-1787, 2016.
- VELASCO, M. *et al.* Infection by *Henneguya* sp. (Myxozoa) in the bone tissue of the gill filaments of the Amazonian catfish *Hypophthalmus marginatus* (Siluriformes). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 3, p. 365-369, 2015.

- VELASCO, M. *et al.* *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**, v. 130, p. 247-252, 2019.
- VIEIRA, D. H. M. D. *et al.* A new species, *Henneguya lacustris* n. sp. (Cnidaria: Myxosporea), infecting the gills of *Astyanax lacustris* from Brazil. **Parasitology Research**, v. 119, n. 12, p. 4259-4265, 2020.
- VIDEIRA, M. *et al.* An anatomopathological study of hepatic coccidiosis (*Calyptospora* sp.) in the Acará-pixuna, *Aequidens plagiozonatus* Kullander, 1984 from the Brazilian state of Pará. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 91-94, 2013.
- VIDEIRA, M. *et al.* An outbreak of myxozoan parasites in farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)(Characidae, Serrasalminae) in the Amazon region, Brazil. **Aquaculture Reports**, v. 3, p. 31-34, 2016.
- VIDEIRA, M. *et al.* Morphological aspects of *Henneguya aequidens* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) in *Aequidens plagiozonatus* Kullander, 1984 (Teleostei: Cichlidae) in the Amazon region, Brazil. **Parasitology research**, v. 114, n. 3, p. 1159-1162, 2015.
- VITA, P. *et al.* Ultrastructural aspects of the myxosporean *Henneguya astyanax* n. sp.(Myxozoa: Myxobolidae), a parasite of the Amazonian teleost *Astyanax keithi* (Characidae). **Diseases of aquatic organisms**, v. 53, n. 1, p. 55-60, 2003.
- WALLIKER, D. Myxosporidea of some Brazilian freshwater fishes. **The Journal of parasitology**, p. 942-948, 1969.
- XAVIER, R. *et al.* Effects of *Goussia* infecting the blue whiting and phylogenetic placement of *Goussia* infecting marine fish off Northern Portugal. **Parasitology Research**, v. 119, p. 2139-2147, 2020.
- YAHALOMI, D. *et al.* A cnidarian parasite of salmon (Myxozoa: *Henneguya*) lacks a mitochondrial genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 10, p. 5358-5363, 2020.
- YOKOYAMA, H. *et al.* Hemorrhagic anemia of carp associated with spore discharge of *Myxobolus artus* (Myxozoa: Myxosporea). **Fish Pathology**, v. 31, n. 1, p. 19-23, 1996.
- YOKOYAMA, H. *et al.* *Henneguya lateolabracis* sp. n.(Myxozoa: Myxosporea), the causative agent of cardiac henneguyosis in Chinese sea bass *Lateolabrax* sp. **Fisheries science**, v. 69, n. 6, p. 1116-1120, 2003.
- YOKOYAMA, H.; GRABNER, D.; SHIRAKASHI, S. Transmission biology of the Myxozoa. In: CARVALHO, ED; DAVID GS; SILVA RJ (ed). **Health and Environment in Aquaculture**. InTech, Croatia, p. 1-42, 2012.
- ZANOLO, R.; YAMAMURA, M. H. Parasitas em tilápias-do-nilo criadas em sistema de tanques-rede. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 2, p. 281-288, 2006.

ZATTI, S. A. *et al.* Novel *Myxobolus* and *Ellipsomyxa* species (Cnidaria: Myxozoa) parasiting *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin, Brazil. **Parasitology international**, v. 67, n. 5, p. 612-621, 2018a.

ZATTI, S. A. *et al.* Novel *Henneguya* spp. (Cnidaria: Myxozoa) from cichlid fish in the Amazon basin cluster by geographic origin. **Parasitology research**, v. 117, n. 3, p. 849-859, 2018b.

ANEXO

ANEXO A - FOLHA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFRA).



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

ATESTADO

Protocolo 013/2014 (CEUA) – 23084.007833/2014-28 (UFRA)

Título do Projeto: Ação microparasitária em hospedeiros aquáticos de interesse econômico na Amazônia.

Docente/Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Edilson Rodrigues matos

Instituição: Instituto da Saúde e Produção Animal – ISPA / UFRA

PARECER

O Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRA, apreciou o protocolo acima e verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794/08 (Lei Arouca), sendo respeitados os Princípios Éticos da Experimentação Animal do CONCEA. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: APROVADO

Liberado para o início da pesquisa sendo obrigatório a entrega nesta CEUA do relatório semestral e de conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no projeto/plano de ensino.

Belém, 28 de maio de 2014.


Profª. Dra. Ana Silveira Sardinha Ribeiro
Coordenadora CEUA/UFRA

ANEXO B – FICHA DE COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO.

DATA:
ESPÉCIE:
LOCAL DE COLETA:
SEXO:
Nº de REGISTRO:

PESO TOTAL:
PESO EVISCERADO:
COMPRIMENTO TOTAL:
COMPRIMENTO PADRÃO:

ANÁLISE DA PRESENÇA DE PARASITAS:

OBSERVAÇÕES:

ANEXO C – FICHA DE PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ.



PREPARAÇÃO DE MATERIAL PARA MICROSCOPIA DE LUZ

MATERIAL..... N°..... DATA:.....
 NORMAL
 ESPECIAL

OBS: ANTES DE INICIAR A CPLHEITA DO MATERIAL BIOLÓGICO PREPARAR TODO O INSTRUMENTAL E MATERIAL NECESSÁRIO E INDISPENSÁVEL AO TRABALHO

OBS: PREPARAÇÃO DE "BONECA DE GAZE" COM MATERIAL PARA SER PROCESSADO

INÍCIO FIM OBS

FIXAÇÃO: TEMPERATURA AMBIENTE

FORMOLAQ 10%/DAVIDSON/AFA/OUTRO	HS	_____	_____	_____
LAVAGEM EM ÁGUA CORRENTE	HS	_____	_____	_____
DUPLA FIXAÇÃO	HS	_____	_____	_____

DESIDRATAÇÃO ESPECIAL

ALC 70	30'	30'	1H	1H	_____	_____	_____
ALC 80	30'	30'	1H	1H	_____	_____	_____
ALC 90	30' (*)	30'	1H	1H	_____	_____	_____
ALC ABS I	30'	60'	1H	1H	_____	_____	_____
ALC ABS II	30'	60'	1H	1H	_____	_____	_____
ALC ABS III	30'	30'	1H	1H	_____	_____	_____
ALC XILOL		30'	1H	1H	_____	_____	_____

DIAFANIZAÇÃO (CLAREAMENTO)

XILOL I	30'	30'	24H	_____	_____	_____
XILOL II	30'	30'	24H	_____	_____	_____

IMPREGNAÇÃO EM ESTUFA A 60° C

BAMHO EM PARAFINA I	30'	30'	24H	_____	_____	_____
BAMHO EM PARAFINA II	30'	60'	24H	_____	_____	_____
BAMHO EM PARAFINA III	30' (*)	60'	24H	_____	_____	_____

INCLUSÃO EM PARAFINA: TEMPERATURA AMBIENTE

INCLUSÃO _____
 TOTAL _____

OBS: (*) PODE DEIXAR A NOITE NO ALCOOL, MAS NUNCA NO XILOL, EM TEMPERATURA AMBIENTE, SOMENTE EM CASOS ESPECIAIS

ANEXO D – FICHA DE PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA.



PREPARAÇÃO DE MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA

MATERIAL..... N°..... DATA.....

() NORMAL

() MICROPARASITAS

OBS: ANTES DE INICIAR A COLHEITA DO MATERIAL BIOLÓGICO PREPARAR TODO O INSTRUMENTAL E MATERIAL NECESSÁRIO E INDISPENSÁVEL AO TRABALHO

INÍCIO FIM OBS

FIXAÇÃO

GLUTARALDEÍDO (T) 2/2,5/3,0/5,0 4°C... 1/2/3 HS

LAVAGEM (T) 4°C... 1/2 HS (*)

ÔSMIO(T) 1/1,5/2/2,5% 4°C... 1/2 HS

DESIDRATAÇÃO

MICOPARASITAS

ALC 50 30' 30' 1H 1H

ALC 70 30' 30' 1H 1H

ALC 75 30' 30' 1H 1H

ALC 80 30' 30' 1H 1H

ALC 90 30' 60' 1H 1H

ALC 95 30' 60' 1H 1H

ALC ABS I 30' 60' 1H 1H

ALC ABS II 30' 60' 1H 1H

ALC ABS III 30' 30' 1H 1H

OX PRO I 15' 15' 1H 1H

OX PRO II 15' 15' 1H 1H

OX PRO III 30' 15' 1H 1H

IMPREGNAÇÃO

OX PRO + EPON (A+B) (3:1) 30' 30' 24H

OX PRO + EPON (A+B) (2:1) 30' 60' 24H

OX PRO + EPON (A+B) (1:1) 30' (*) 60' 24H

OX PRO + EPON (A+B) (1:2) 30' 60' 24H

OX PRO + EPON (A+B) (1:3) 30' 30' 24H

EPON TOTAL AMBIENTE 30'/60' 120' 12/24H

EPON TOTAL ESTUFA 60°C 30'/60' 120' 12/24H

INCLUSÃO:

ENCAPSULAR E MANTER EM ESTUFA A 60°C...3DIAS

OBS: (*) PODE DEIXAR A NOITE A 4°C

APÊNDICE

APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA ACTA SCIENTIARUM. BIOLOGICAL SCIENCES

Título: Renal myxoboliosis of *Metynnis hypsauchen* in the Brazilian Amazon: morphological and histopathological aspects

Autores: **Jhonata Eduard Farias de Oliveira**; Rayline Thaimenne Alves Figueredo; Maria do Perpétuo Socorro Progene Vilhena; José Francisco Berrêdo; José Ledamir Sindeaux Neto; Edilson Matos; Michele Velasco

ISSN: 1807-863X

DOI: <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v42i1.50267>

Qualis: B3 – Área de Zootecnia/Recursos Pesqueiros



Renal myxoboliosis of *Metynnis hypsauchen* in the Brazilian Amazon: morphological and histopathological aspects

Jhonata Eduard Farias de Oliveira¹, Rayline Thaimenne Alves Figueredo², Maria do Perpétuo Socorro Progene Vilhena³, José Francisco Berrêdo⁴, José Ledamir Sindeaux-Neto⁵, Edilson Matos⁵ and Michele Velasco^{6*}

¹Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brazil. ²Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. ³Universidade Federal Rural da Amazônia, Tomé-Açu, Pará, Brazil. ⁴Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, Pará, Brazil. ⁵Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brazil. ⁶Universidade Federal Rural da Amazônia, PA-256, 68627-451, Paragominas, Pará, Brazil. *Author for correspondence. E-mail: michele.velasco.mv@gmail.com

ABSTRACT. In their natural habitat, fish are constantly threatened by ichthyoparasites, notably those from the Phylum Cnidaria, Hatschek, 1888, represented by species of the Myxozoa, responsible for infections in fish that cause complications to their health that can lead to death. Among these parasites, the genus *Myxobolus* Butschli, 1882 is responsible for the largest number of infections described in fishes from the Americas. This study describes the morphological and histopathological aspects of parasitism by *Myxobolus* sp. in specimens of *Metynnis hypsauchen*, obtained from the Capim river, in the municipality of IPIXUNA DO PARÁ, Pará, Brazil. During the months of August and March, 2018, 20 animals were captured, euthanized and autopsied. With the aid of a stereomicroscope an external and internal investigation was performed on the animals for the purpose of finding lesions or parasitic cysts, followed by confirmation of infection in Light Microscopy (ML). Cysts and Fragments from parasitized tissues were processed using techniques for histology and Scanning Electron Microscopy (SEM). For histology they were stained with Hematoxylin-Eosin (H-E) and Ziehl-Neelsen and for SEM Micrographs were captured, using equipment from the Museu Paraense Emílio Goeldi. The prevalence of parasitism was 60% (12/20) of the specimens, and the cysts were in the epithelium and lumen of the renal tubules, causing histopathological changes. The characteristics of the parasite spores are those associated with the genus *Myxobolus*, with an ellipsoid format, two polar capsules and a sporoplasm region. It was possible to confirm a high parasite load of *Myxobolus*, with compromised renal functions. This study is the first to describe Myxospore in *Metynnis hypsauchen*.

Keywords: Amazon; Serrasalminidae; myxozoan; kidneys.

Received on October 17, 2019.
Accepted on February 13, 2020.

Introduction

The Capim River, located in the municipality of IPIXUNA DO PARÁ in the Brazilian Amazon, has an extension of about 600 km of areas. *Metynnis hypsauchen* Müller & Troschel, 1844, Serrasalminidae, popularly known in the Amazon region as “white pacu”, is one of the species that integrates local diversity (Montag, Freitas, Wosiacki, & Barthem, 2008; Garavello & Oliveira, 2014). It is sold in some locations as an ornamental fish (Sánchez Riveiro, García Vásquez, Vásquez Bardales, & Alcántara Bocanegra, 2011). It belongs to the most diverse genus in the family, with 15 species (Boyle & Herrel, 2018; Ota, Daniel, & Jégu, 2016).

The Myxozoa, belonging to the Phylum Cnidaria, Hatschek 1888, are made up of parasitic spores that infect vertebrates and invertebrates (Békési, Székely, & Molnár, 2002; Okamura, Gruhl, & Bartholomew, 2015; Foox & Siddall, 2015). There are approximately 2,600 species described (Okamura, Hartigan, & Naldoni, 2018). This diversity is attributed to the use of fish as intermediate hosts (Holzer et al., 2018). They are found in practically all organs, such as: gills, scales, fins, gallbladder and other vital organs (Lom & Dyková, 2006; Gupta & Kaur, 2017).

Myxobolidae family is the most frequent Myxozoan group found in fish in the Americas (Vidal, Iannacone, Whipps, & Luque, 2017) of which the genus *Myxobolus* Butschli, 1882 is the largest, with more

than 905 species (Eiras, Zhang, & Molnár, 2014; Eiras, Molnár, & Lu, 2005) of which 4 have been described in Brazil, mainly in the Amazon region (Vidal et al., 2017). They have ellipsoid-shaped spores, with two polar pyriform capsules and a binucleated sporoplasm (Lom & Dyková, 2006). Fish are their main vertebrate hosts, but they have also been reported in amphibians and reptiles (Eiras et al., 2005; Eiras et al., 2014). "Whirling disease" is the best known disease, caused by *Myxobolus cerebralis*, resulting from a disoriented ear capsule infection in which the fish chases its own tail in circular movements, as the result of infection in the auditory capsule that leaves it disoriented (Lom & Dyková, 2006; Hoffman, 1990; Faruk, 2018).

This study describes parasitism by *Myxobolus* with a morphological and histopathological description in the teleost fish *Metynnis hypsauchen* collected from the Capim river when it passes through the municipality of Ipixuna do Pará.

Material and methods

Fish and sample collection

During the months of August 2018 and March 2019, 20 specimens of *Metynnis hypsauchen* fish were acquired. With the help of fishing gear, they were captured and transported alive in plastic bags with water from their habitat and artificial aeration to the *Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo*, at the *Universidade Federal Rural da Amazônia*, in Belém, Pará, Brazil (License from SISBIO / ICMBio 62276-1).

The animals were anesthetized with tricaine (MS-222) at a concentration of 50 mg L⁻¹ and then autopsied (License from Animal Use Ethics Committee n° 011/2014) to search for parasites. A stereomicroscope was used, to observe lesions and/or cysts of parasites on the integumentary surface and internal organs. In tissues and organs with probable presence of parasites, small fragments were removed for slide assembly with the addition of a drop of water and observation under a light microscope and with a Differential Interference Contrast Microscope (DIC) (Nomarski) for confirmation.

Morphometric Analysis

Morphometric data in micrometers (µm), were obtained from mature and fresh spores (mean, standard deviation range in parentheses). According to recommendations from Lom and Arthur (1989) the following variables were analyzed: Length of spores (LS), width of spores (WS), length of polar capsule (PCL) and width of polar capsule (PCW). Findings were compared with those from specimens of *Myxobolus* sp. described in other studies, using Principal Component Analysis (PCA) and the hierarchical method UPGMA, employing the PAST 3.0 software (Hammer, Harper, & Ryan, 2001).

Histology

Histological processing began by removing parasitized kidney fragments that were fixed in Davidson solution (95% alcohol, formaldehyde, acetic acid and distilled water) for 24 hours and dehydrated in progressive alcohol concentration, then paraffinized and microtomed with 0.5 µm thick sections and finally stained with Hematoxylin-Eosin and Ziehl-Neelsen (Luna, 1968).

Scanning Electron Microscopy

For analysis with Scanning Electron Microscopy (SEM), the parasitized kidney fragments were fixed in glutaraldehyde 5%, buffered with sodium cacodylate with Ph 7.2 for 12 hours at 4°C. Next, the samples were washed in the same buffering solution and fixed in OsO₄ at 2%, and buffered for 3 hours without temperature change. Later on, they were desiccated in an increasing propylene oxide series and dried to the critical point, metallized with a thin layer of gold and photographed with a Tescan Mira3 scanning electron microscope, with an FEG electron gun (field emission gun), located at the *Centro de Microscopia do Museu Paraense Emílio Goeldi* in Belém, PA.

Results

Light microscopy and ultrastructure

In the evaluation using light microscopy, 60% (12/20) of the specimens autopsied presented infection in the kidneys from *Myxobolus* sp. The spores were located in the renal tubules (Figures 1a-1b). They had an

elliptical format, measuring 12.3-12.7 (12.5 ± 0.3) μm length and 7.2-7.5 (7.3 ± 0.2) μm width and containing sporoplasm (Figure 1c). The polar capsules were the same size and elongated, with 6.1-6.3 (6.2 ± 0.2) μm length and 2.79-2.9 (2.8 ± 0.07) μm width. The polar filaments presented 8-10 turns (Figure 2). Observations using scanning electronic microscopy, showed spores with two smooth united valves and the suture line region between the valves (Figures 3a – 3c).

The microcut of the kidneys showed cysts, containing spores of *Myxobolus* sp., with typical polar capsules (Figure 4f), located in the mucosa and epithelium of the Proximal Convoluted Tubules (PCT) of the nephron, causing deformation and compression of the cuboidal cells of the epithelium, and the lateral displacement of the lumen (Figures 4 a-f). Some free spores were also found in the renal parenchyma (Figure 4 d). In the Hematoxylin-Eosin stain, mononuclear leucocyte infiltrate was noticed close to the infection site and multifocal necrosis (Figures 4a and c). Melanomacrophagic bodies were also visualized in the PCT wall, with a more prominent coloring (Figure 4b), a typical finding with many infections.

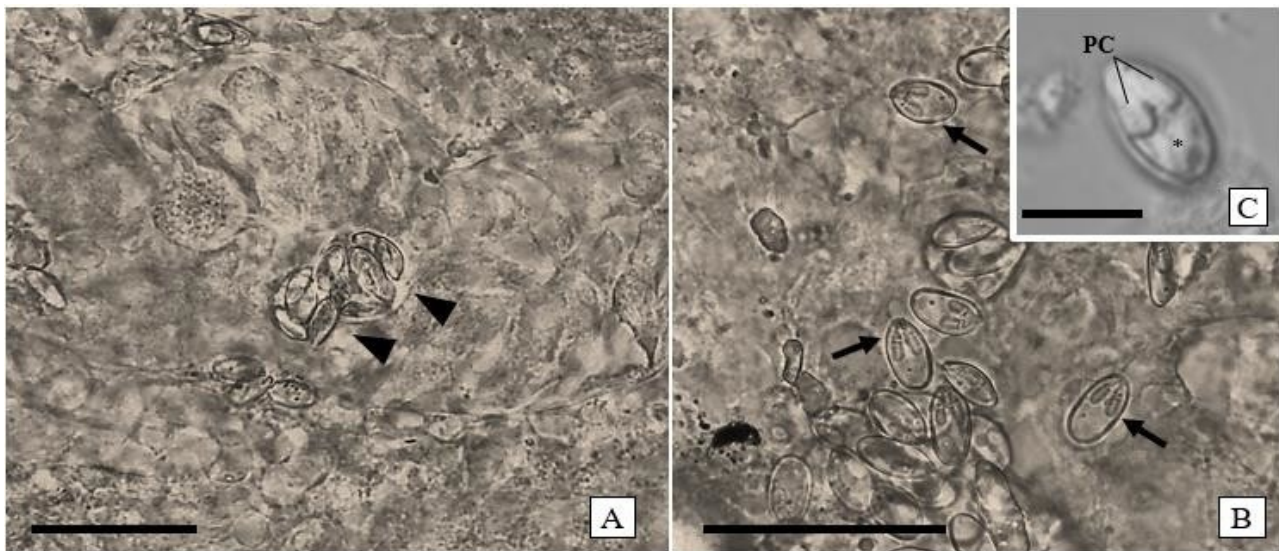


Figure 1. Photomicrographs of mature to fresh myxospore of *Myxobolus* sp. infecting the kidneys of *Metynnis hypsauchen*. A and B. Observation of cysts (black arrow point) and spores (arrows). C. Spore observed with Microscopy using Differential Interference Contrast (DIC), notably the polar capsules (PC) and sporoplasm (*). Scale bar= 20 μm .

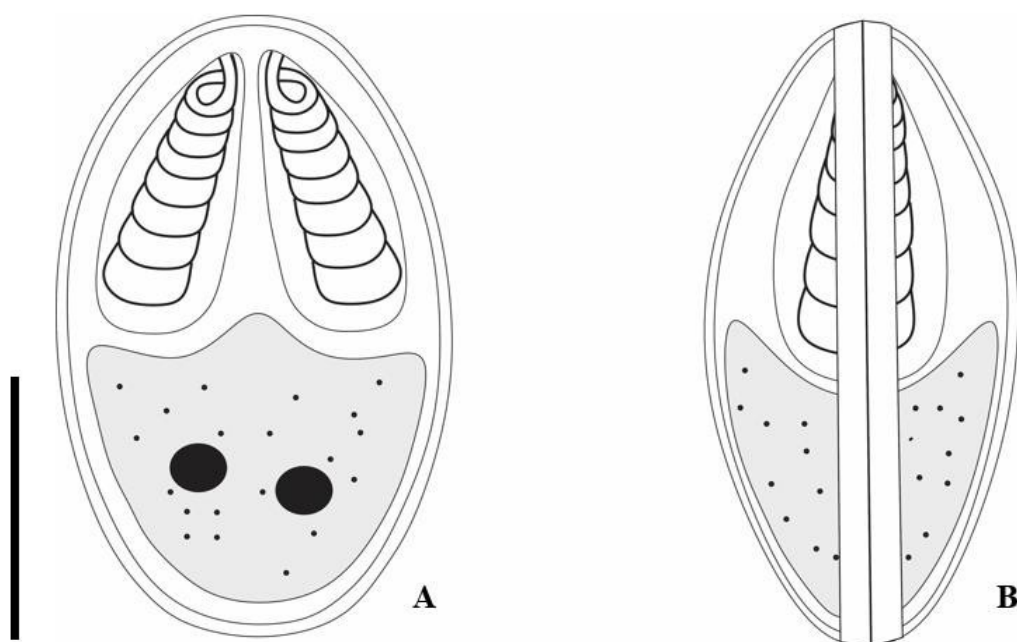


Figure 2. Schematic drawing of mature spores of *Myxobolus* sp. A. Front view; B. Side view. Scale bar = 5 μm .

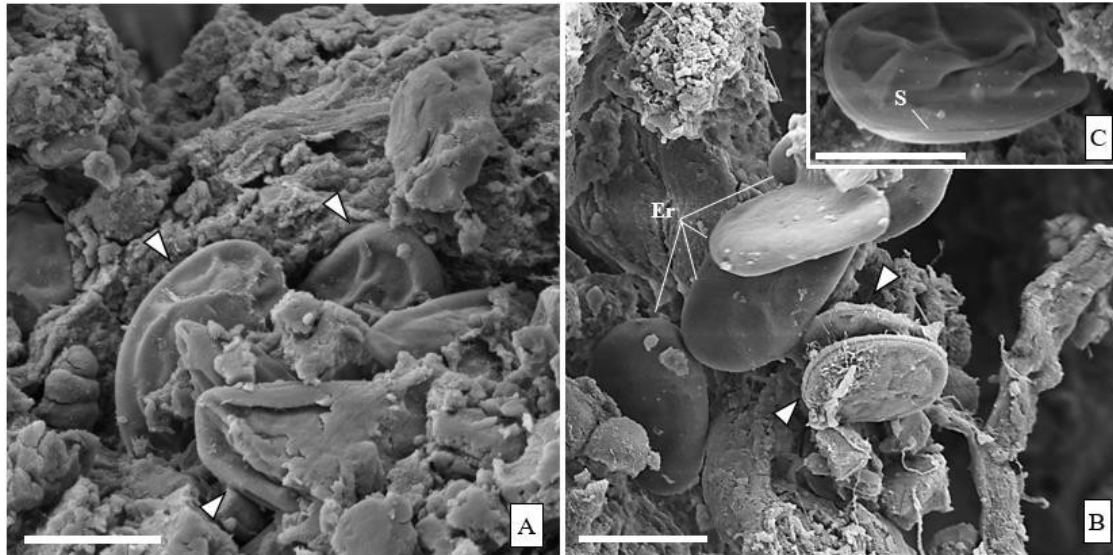


Figure 3. Scanning electron micrographs of myxospore of *Myxobolus* sp. infecting the kidneys of *Metynnis hypsauchen*. A and B. Observation of mature myxospores (white arrow point) and with some myxospores close to erythrocytes (Er). C. The suture line of a mature myxospore is highlighted (S). Scale bar= 5µm.

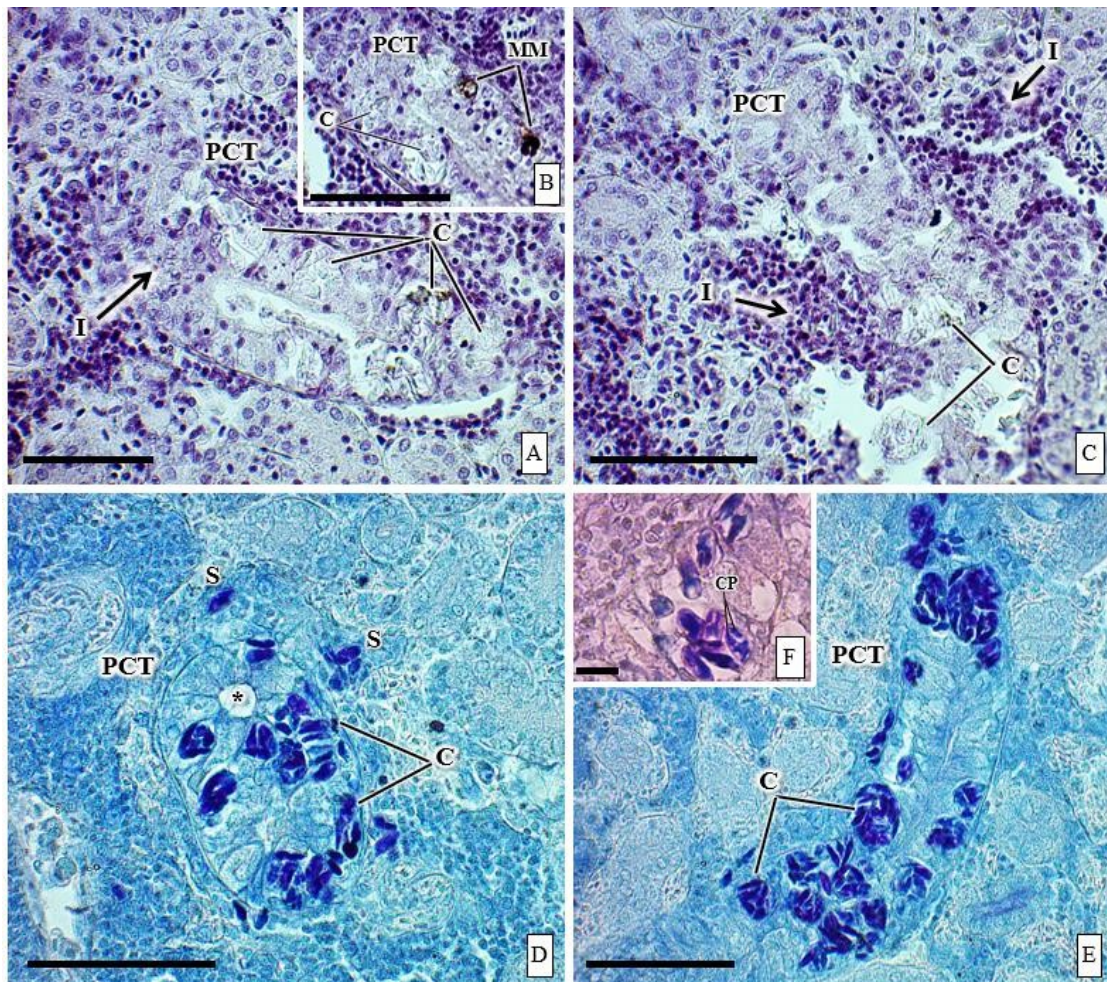


Figure 4. Photomicrographs of tissue sections from the kidney of *Metynnis hypsauchen* infected by *Myxobolus* sp., showing longitudinal (A and E) and cross-section cuts (C and D) of proximal convoluted tubules (PCT). A, B and C. Cysts of mature myxospores (C) causing compression and deformation in the cuboid epithelium of the proximal convoluted tubule (PCT). Note the inflammatory mononuclear infiltrate (I) around the infected tubule and the multifocal necrosis area (arrow) and melanomacrophages (MM) close to the infection site. Hematoxylin and Eosin. D and E. Cysts of mature myxospores in the cuboid epithelium of the proximal convoluted tubules (PCT), causing deformation and displacement of the lumen (*) to the side of the tubule. Observation of free myxospores in the renal parenchyma (S). Scale bar= 50µm. F. Detail of the myxospore found in the polar capsules (CP). Scale bar= 10µm.

The morphometric analysis demonstrated that the *Myxobolus* sp. spore, was significantly different from spores of the majority of the species described at different infection sites, with *M. metynniss* found in the orbicular tissue of *Metynniss argenteus* and *M. aureus* causing liver infection in *Salminus brasiliensis*, were the closest (Figure 6), in length and width of spore (Table 1). However, it is not possible to assert the similarity with both species, due to the negative relationship in the ordering and Euclidean distance axes (Figures 5 and 6).

Table 1. Comparison of morphologic data between spores of *Myxobolus* spp. basead on 20 spores measurements. All measured in micrometers.

Species	Spore		Polar Capsule		Filament Coils	Host/Infection Site	References
	Length	Width	Length	Width			
<i>Myxobolus</i> sp.	12.3-12.7 (12.5±0.3)	7.2-7.5 (7.3±0.2)	6.1-6.3 (6.2±0.2)	2.79-2.9 (2.8±0.07)	8-10	<i>Metynniss hypsauchen</i> , kidneys	Present Study
<i>M. maculatus</i>	21 (19.7-23)	8.9 (7.9-9.5)	12.7 (11.8-13.8)	3.2 (3-3.6)	14-15	<i>Metynniss maculatus</i> , kidneys	Casal, Matos, & Azevedo (2002)
<i>M. serrasalmi</i>	(14.8±3.1)	(8.6±3.9)	(7.7±2.3)	(3.1±0.9)	-	<i>Serrasalmus rhombeus</i> , kidneys	Walliker (1969)
<i>M. hilarii</i>	9.8 - 13.4 (11.5±0.8)	9.7 - 12.4 (11±0.7)	6 - 7.2 (6.5±0.4)	3.6 - 5.3 (4±0.2)	5-7	<i>Brycon hilarii</i> , kidneys	Capodifoglio, Adriano, Milanin, Silva, & Maia (2016)
<i>M. tapajosi</i>	15 (13.5-17)	10.7 (9.6-11.4)	5.8 (4.6-7.1)	3 (2.3-3.8)	6-7	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> , branchial filaments	Zatti et al. (2018)
<i>M. aureus</i>	(12.6±0.5)	(8.3±0.3)	(5.7±0.3)	(2.9±0.2)	7-8	<i>Salminus brasiliensis</i> , liver	Carriero, Adriano, Silva, Ceccarelli, & Maia (2013)
<i>M. brycon</i>	6.5-7.2 (6.9±0.6)	3.9-4.8 (4.2±0.5)	3.8-4.7 (4.2±0.6)	1.7-2.5 (1.9±0.6)	8-9	<i>Brycon hilarii</i> , gills	Azevedo, Casal, Marques, Silva, & Matos (2011)
<i>M. piraputangae</i>	(10.1±0.5)	(8.7±0.5)	(5.2±0.4)	(3.0±0.3)	4-5	<i>Brycon hilarii</i> , kidneys	Carriero et al. (2013)
<i>M. metynniss</i>	13.1 (12.9-13.5)	7.8 (7.5-8.3)	5.2 (5.0-5.5)	3.2 (3.0-3.6)	8-9	<i>Metynniss argenteu</i> , orbicular tissue	Casal, Matos, & Azevedo (2006)
<i>M. marajoensis</i>	10.9 (10-11.6)	5.1 (4.2-5.4)	5.2 (5.3± 0.6)	1.5 (1.6±0.36)	-	<i>Rhamdia quelen</i> , Intestine	Abrunhosa, Sindeaux-Neto, Santos, Hamoy, & Matos (2017)
<i>M. matosi</i>	9.1-10.8 (9.6±0.4)	6.5-7.6 (7.0±0.3)	3.3-5.0 (4.3±0.4)	1.6-2.2 (1.9±0.1)	-	<i>Colossoma macropomum</i> , operculum	Capodifoglio, Adriano, Silva, & Maia (2019)

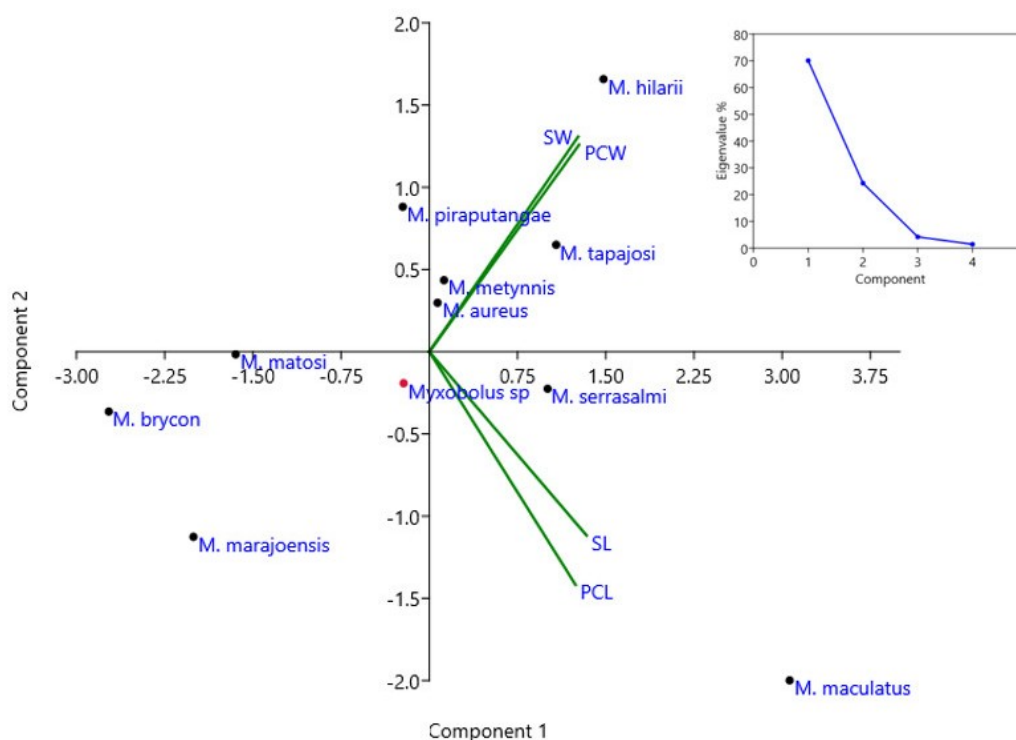


Figure 5. Principal Component Analysis (PCA). Correlation of morphometric parameters for the species. Length of spore (SL), Width of spore (SW), Length of Polar Capsule (PCL), Width of Polar Capsule (PCW).

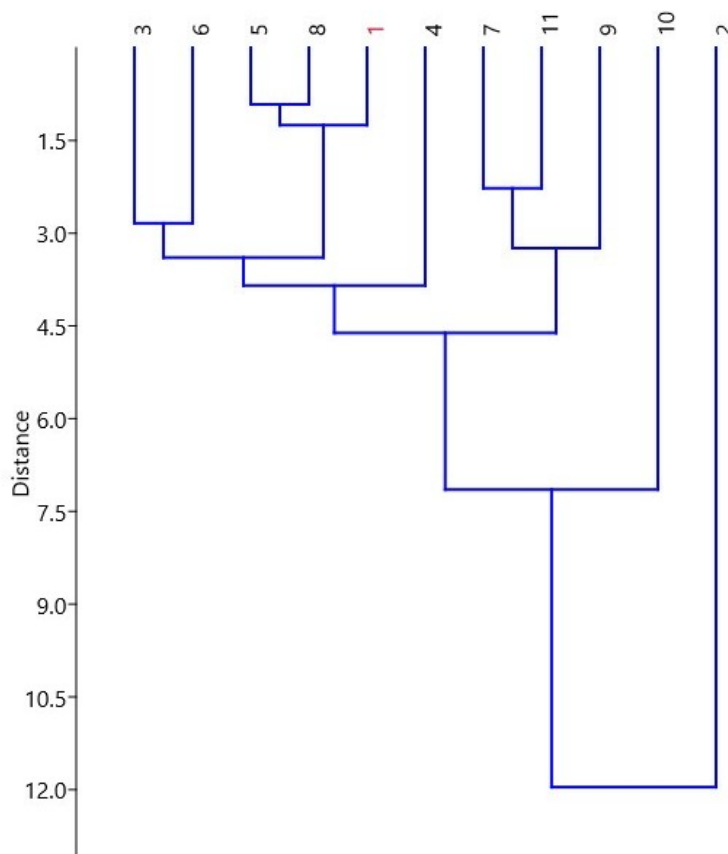


Figure 6 Similarity dendrogram (UPGMA) between spores of *Myxobolus* spp. 1- *Myxobolus* sp.; 2- *M. maculatus*; 3- *M. serrasalmi*.; 4- *M. hilarii*; 5- *M. metynnis*; 6- *M. tapajosi*; 7- *M. matosi*; 8- *M. aureus*; 9- *M. marajoensis*; 10- *M. brycon*; 11- *M. piraputangae*.

Discussion

In this study, the prevalence of *Myxobolus* sp. in the renal tubules was 60% (12/20) in *Metynnis hypsauchen* kidneys. When compared with *M. metynnis* (Casal et al., 2006), *M. tapajosi* (Zatti et al., 2018), *M. matosi* (Capodifoglio et al., 2019) and *M. niger* (Mathews, Maia, & Adriano, 2016), species described for the north of Brazil, which respectively presented 40%, 23.5%, 20%, and 13.7% of parasite prevalence, the species studied for this paper presented a higher incidence.

The morphometric analysis demonstrated that the *Myxobolus* sp. spore, was significantly different from that of the majority of the species described at different infection sites, with *M. metynnis* (Casal et al., 2006) found in the orbicular tissue of *Metynnis argenteus* and *M. aureus* (Carriero et al., 2013) causing liver infection in *Salminus brasiliensis*, were the closest (Figure 6), in length and width of spore (Table 1). However, it is not possible to assert a similarity with both species, due to the negative relationship in the ordering and Euclidean distance axes (Figures 5 and 6).

In terms of histopathological findings, they were similar to those from other studies, in which asynchronous spore development led to the compression and degeneration of the tubular cells, leading to a change in lumen size (Capodifoglio et al., 2016; Casal et al., 2002; Abruñhosa, Sindeaux-Neto, Hamoy, & Matos, 2018). There is also a variation in the degree of pathogenicity; in some cases, there was hyaline degeneration, glomerular congestion, cellular edema and formation of a connective capsule around the spores, as reported in kidney infections in the pacu species *Piaractus mesopotamicus* (Manrique, Figueiredo, Belo, Martins, & Molnár, 2017; Campos, Moraes, & Moraes, 2008).

In Hematoxylin-eosin, melanomacrophage cells were observed in the wall of the proximal contorted tubule (Figure 3b), indicating an immune response by the host to the parasitic agent (Agius & Roberts, 2003; Yokoyama, Ogawa, & Wakabayashi, 1995). According to Molnár (2007) some species of Myxozoa have a form of infection characterized by the prevalence of several spores, mainly in the kidney interstitium coming from the bloodstream, which are phagocytosed, stored and destroyed by melanomacrophages, and are regularly seen. *Myxobolus cyprini*, is an example of a species that produces spores in the skeletal muscles and in several organs, and as these mature, they are transported to the kidneys where they are eliminated or

are retained to be destroyed by macrophages (Molnar & Gayer, 1985). Manrique et al. (2017) Found *Myxobolus* spores with structural deformations within the melanomacrophage centers.

This type of infection described is the one most similar to that reported in this paper, although we did not find melanomacrophages phagocytosing and destroying the spores, and the morphological comparison did not correspond to other species described in other organs, which made it difficult to determine the site of origin of the spore. Baki et al. (2015) note that this is the main problem found in infections by myxozoans identifying if the kidneys are the original site of infection or merely a storage point for bloodstream-borne spores.

The inflammatory process revealed in this study is attributed to mononucleated cells due to the small number of melanomacrophages, which does not characterize typical acute infections caused by these cells. Necrotic areas also contribute to inflammation; according to Maftuch et al. (2018), they provide the function of increasing the inflammatory response locally and in nearby regions.

Conclusion

Metynnis hypsauchen is an important ornamental fish species sold by several South American countries. Because of that, these histopathological results are important for understanding the effects of parasitism by *Myxobolus* in the kidneys. We emphasize that this is the first description of Myxosporidia in this host.

Acknowledgements

The authors thank the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* and the *Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo* and the *Centro de Microscopia Eletrônica do Museu Paraense Emílio Goeldi*, for all of their structural support in carrying out the experiments.

References

- Abrunhosa, J., Sindeaux-Neto, J. L., Hamoy, I., & Matos, E. R. (2018). A new species of Myxosporidia, *Henneguya quelen*, from silver catfish *Rhamdia quelen* (Siluriforme: Pimelodidae) in the Amazonian region. *Parasitology Research*, 117(12), 3809–3820. doi:10.1007/s00436-018-6086-1
- Abrunhosa, J., Sindeaux-Neto, J. L., Santos, Â. K., Hamoy, I., & Matos, E. (2017). *Myxobolus marajoensis* sp. n. (Myxosporidia: Myxobolidae), parasite of the freshwater catfish *Rhamdia quelen* from the Brazilian Amazon region. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 26(4), 465–471. doi:10.1590/S1984-29612017067
- Agius, C., & Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26(9), 499–509. doi:10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x
- Azevedo, C., Casal, G., Marques, D., Silva, E., & Matos, E. (2011). Ultrastructure of *Myxobolus brycon* n. sp. (Phylum Myxozoa), parasite of the piraputanga fish *Brycon hilarii* (Teleostei) from Pantanal (Brazil). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 58(2), 88–93. doi:10.1111/j.1550-7408.2010.00525.x
- Baki, A. A. S. A., Haleem, H. M. A., Sakran, T., Zayed, E., Ibrahim, K. E., & Al-Quraishy, S. (2015). Two *Myxobolus* spp. infecting the kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the River Nile at Beni-Suef governorate, Egypt, and the associated renal changes. *Parasitology Research*, 114(3), 1107–1112. doi:10.1007/s00436-014-4282-1
- Békési, L., Székely, C., & Molnár, K. (2002). Atuais conhecimentos sobre Myxosporidia (Myxozoa), parasitas de peixes. Um estágio alternativo dos parasitas no Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 39(5), 271–276. doi: 10.1590/S1413-95962002000500010
- Boyle, K. S., & Herrel, A. (2018). Neurocranium shape variation of piranhas and pacus (Characiformes: Serrasalminae) in association with ecology and phylogeny. *Biological Journal of the Linnean Society*, 125(1), 93–114. doi:10.1093/BIOLINNEAN/BLY092
- Campos, C. M., Moraes, J. R. E., & Moraes, F. R. D. (2008). Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no Rio Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(4), 200–205. doi:10.1590/s1984-29612008000400006

- Capodifoglio, K. R. H., Adriano, E. A., Milanin, T., Silva, M. R. M., & Maia, A. A. M. (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. doi:10.1016/j.parint.2015.12.006
- Capodifoglio, K. R. H., Adriano, E. A., Silva, M. R. M., & Maia, A. A. M. (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. doi:10.1016/j.actatropica.2018.12.026
- Carriero, M. M., Adriano, E. A., Silva, M. R. M., Ceccarelli, P. S., & Maia, A. A. M. (2013). Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. *PLoS One*, *8*(9), e73713. doi:10.1371/journal.pone.0073713
- Casal, G., Matos, E., & Azevedo, C. (2002). Ultrastructural data on the spore of *Myxobolus maculatus* n. sp. (Phylum Myxozoa), parasite from the Amazonian fish *Metynnis maculatus* (Teleostei). *DAO - Diseases of Aquatic Organisms*, *51*(2), 107–112. doi:10.3354/dao051107
- Casal, G., Matos, E., & Azevedo, C. (2006). A new myxozoan parasite from the Amazonian fish *Metynnis argenteus* (Teleostei, Characidae): light and electron microscope observations. *Journal of Parasitology*, *92*(4), 817–821. doi:10.1645/ge-750r.1
- 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. doi:10.1007/s11230-004-6343-9
- 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. doi:10.1007/s11230-014-9484-5
- Faruk, M. A. R. (2018). Fish parasite: infectious diseases associated with fish parasite. In M. L. Bari & K. Yamazaki (Eds.), *Seafood Safety and Quality* (p. 144–165). Boca Raton: CRC Press.
- Foxx, J., & Siddall, M. E. (2015). The road to cnidaria: history of phylogeny of the Myxozoa. *Journal of Parasitology*, *101*(3), 269–274. doi:10.1645/14-671.1
- Garavello, J. C., & Oliveira, A. K. (2014). Ichthyological overview and remarks on freshwater fishes from Capim river, lower Amazon basin, Brazil. *Open Journal of Ecology*, *4*(13), 797–806. doi:10.4236/oje.2014.413068
- Gupta, A., & Kaur, H. (2017). Record of new host, site of infection and locality of two *Myxobolus* infecting freshwater fishes in Ranjit Sagar wetland of Punjab (India). *International Journal of Biology Research*, *2*(4), 6–11. doi:10.22271/biology
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, *4*(1), 1–9.
- Hoffman, G. L. (1990). *Myxobolus cerebralis*, a worldwide cause of salmonid whirling disease. *Journal of Aquatic Animal Health*, *2*(1), 30–37. doi:10.1577/1548-8667(1990)002<0030:MCAWCO>2.3.CO;2
- Holzer, A. S., Sojková, P. B., Torrijos, A. B., Lövy, A., Hartigan, A., & Fiala, I. (2018). The joint evolution of the Myxozoa and their alternate hosts: a cnidarian recipe for success and vast biodiversity. *Molecular Ecology*, *27*(7), 1651–1666. doi:10.1111/mec.14558
- Lom, J., & Arthur, J. R. (1989). A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *Journal of Fish Diseases*, *12*(2), 151–156. doi:10.1111/j.1365-2761.1989.tb00287.x
- Lom, J., & Dyková, I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica*, *53*(1), 1–36. doi:10.14411/fp.2006.001
- Luna, L. G. (1968). *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. New York, NY: Blakiston Division.
- Maftuch, M., Sanoesi, E., Farichin, I., Saputra, B. A., Ramdhani, L., Hidayati, S., ... Prihanto, A. A. (2018). Histopathology of gill, muscle, intestine, kidney, and liver on *Myxobolus* sp.-infected Koi carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Parasitic Diseases*, *42*(1), 137–143. doi:10.1007/s12639-017-0955-x
- Manrique, W. G., Figueiredo, M. A. P., Belo, M. A. A., Martins, M. L., & Molnár, K. (2017). *Myxobolus* sp. and *Henneguya* sp. (Cnidaria: Myxobolidae) natural co-infection in kidney of *Piaractus mesopotamicus* (Characiformes: Serrasalminidae). *Parasitology Research*, *116*(9), 1–16. doi:10.1007/s00436-017-5571-2

- 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. doi:10.1016/j.actatropica.2016.03.016
- Molnár, K. (2007). Site preference of myxozoans in the kidneys of Hungarian fishes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 78(1), 45–53. doi:10.3354/dao01827
- Molnar, K., & Gayer, É. K. (1985). The pathogenicity and development within the host fish of *Myxobolus cyprini* Doflein, 1898. *Parasitology*, 90(3), 549–555. doi:10.1017/S0031182000055530
- Montag, L. F. A., Freitas, T. M. S., Wosiacki, W. B., & Barthem, R. B. (2008). Os peixes da Floresta Nacional de Caxiuanã (municípios de Melgaço e Portel, Pará - Brasil). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi – Ciências Naturais*, 3(1), 11–34. doi:10.5123/s1981-81142008000100002
- Okamura, B., Gruhl, A., & Bartholomew, J. L. (2015). An introduction to Myxozoan evolution, ecology and development. In B. Okamura, A. Gruhl & J. L. Bartholomew (Eds.), *Myxozoan evolution, ecology and development* (p. 1–441). Cham, SW: Springer International Publishing.
- Okamura, B., Hartigan, A., & Naldoni, J. (2018). Extensive uncharted biodiversity: the parasite dimension. *Integrative and Comparative Biology*, 58(6), 1132–1145. doi:10.1093/icb/icy039
- Ota, R. P., Daniel, L. H. R. P., & Jégu, M. (2016). A new Silver Dollar species of *Metynnis* Cope, 1878 (Characiformes: Serrasalminidae) from Northwestern Brazil and Southern Venezuela. *Neotropical Ichthyology*, 14(4), e160023. doi:10.1590/1982-0224-20160023
- Sánchez Riveiro, H., García Vásquez, A., Vásquez Bardales, J., & Alcántara Bocanegra, F. (2011). *Peces ornamentales amazónicos: catálogo 2011*. Iquitos, PE: IIAP.
- Vidal, L. P., Iannacone, J., Whipps, C. M., & Luque, J. L. (2017). Synopsis of the species of Myxozoa Grassé, 1970 (Cnidaria: Myxosporidia) in the Americas. *Neotropical Helminthology*, 11(2), 413–511.
- Walliker, D. (1969). Myxosporidia of some Brazilian freshwater fishes. *The Journal of Parasitology*, 55(5), 942–948. doi:10.2307/3277155
- Yokoyama, H., Ogawa, K., & Wakabayashi, H. (1995). *Myxobolus cultus* n. sp. (Myxosporidia: Myxobolidae) in the goldfish *Carassius auratus* transformed from the Actinosporidian stage in the Oligochaete *Branchiura sowerbyi*. *The Journal of Parasitology*, 81(3), 446–451. doi:10.2307/3283830
- Zatti, S. A., Atkinson, S. D., Maia, A. A. M., 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. doi:10.1016/j.parint.2018.06.005

APÊNDICE B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA (RBPV).

Título: Hepatic coccidiosis in *Serrasalmus rhombeus* Linnaeus, 1766 from the Amazon basin: morphological and histopathological aspects.

Autores: **Jhonata Eduard Farias de Oliveira**; Rayline Thaimenne Alves Figueredo; José Ledamir Sindeaux Neto; Maria do Perpétuo Socorro Progene Vilhena; José Francisco Berrêdo; Edilson Matos; Michele Velasco

ISSN: 1984-2961

DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021007>

Qualis: B1 – Área de Zootecnia/Recursos Pesqueiros

Hepatic coccidiosis in *Serrasalmus rhombeus* Linnaeus, 1766 from the Amazon basin: morphological and histopathological aspects

Coccidiose hepática em *Serrasalmus rhombeus* Linnaeus, 1766 da Amazônia paraense: aspectos morfológicos e histopatológicos

Jhonata Eduard Farias de Oliveira¹; Rayline Thaimenne Alves Figueredo²; José Ledamir Sindeaux-Neto³; Maria do Perpétuo Socorro Progene Vilhena⁴; José Francisco Berrêdo⁵; Edilson Matos^{1,3}; Michele Velasco^{6*} 

¹ Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais, Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém, PA, Brasil

² Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil

³ Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo, Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém, PA, Brasil

⁴ Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Tomé-Açu, PA, Brasil

⁵ Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, PA, Brasil

⁶ Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA Campus Paragominas, Paragominas, PA, Brasil

How to cite: Oliveira JEF, Figueredo RTA, Sindeaux-Neto JL, Vilhena MPSP, Berrêdo JF, Matos E, et al. Hepatic coccidiosis in *Serrasalmus rhombeus* Linnaeus, 1766 from the Amazon basin: morphological and histopathological aspects. *Braz J Vet Parasitol* 2021; 30(1): e026120. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021007>.

Abstract

Calyptospora species are coccids that commonly cause liver infections in fish all around the world. This paper describes the morphology and histopathological characteristics of liver infection caused by *Calyptospora* sp. in black piranha *Serrasalmus rhombeus*, from the Capim River, in the municipality of Ipixuna do Pará, state of Pará (Brazil). Specimens were collected, analyzed and necropsied and tissue fragments containing parasites were prepared for histology and scanning electron microscopy. Parasitism was detected in 33.0% of the analyzed specimens, which had spherical oocysts in the liver, with four pyriform sporocysts presenting sporozoites internally. A histological examination revealed oocysts positioned close to blood vessels, causing necrosis and degeneration of hepatic parenchyma, while the presence of mononuclear cell infiltrate and melanomacrophages indicated the onset of an inflammatory process. This is the first record of the genus *Calyptospora* in fish from the Capim River.

Keywords: Amazon basin, *Calyptospora*, histopathology, piranha.

Resumo

Calyptosporídeos são coccídeos constantemente encontrados causando infecções hepáticas em peixes de todo o planeta. Este estudo descreve a morfologia e características histopatológicas da infecção hepática causada por *Calyptospora* sp. encontrados em *Serrasalmus rhombeus*, a piranha negra, oriunda do rio Capim, em Ipixuna do Pará, Brasil. Os animais foram coletados, analisados e necropsiados; fragmentos teciduais com a presença dos parasitos foram processados para histologia e microscopia eletrônica de varredura. O parasitismo ocorreu em 33,0% dos espécimes analisados, onde foram encontrados oocistos esféricos no fígado, com esporocistos piriformes, apresentando internamente esporozoítos. No exame histológico, os oocistos estavam dispostos próximos aos vasos sanguíneos, causando necrose e degeneração do parênquima hepático; a presença de infiltrado de células mononucleares e melanomacrófagos indicaram o início de um processo inflamatório. Este é o primeiro registro do gênero *Calyptospora* em peixes do rio Capim.

Palavras-chave: Amazônia, *Calyptospora*, histopatologia, piranha.

Received November 10, 2020. Accepted January 21, 2021.

Financial support: Scholarship PQ 1 D CNPq Process 310068 / 2019-3 and PVNS UNIFAP / CAPES Process 8887.314368/2019-00.

*Corresponding author: Michele Velasco Oliveira da Silva. E-mail: michele.velasco.mv@gmail.com



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Coccids, a subclass of the phylum Apicomplexa, are intracellular parasites that have a wide variety of host fish, from Chondrichthyes (elasmobranches) to Osteichthyes, which are represented by freshwater and saltwater teleosts that occur worldwide (Dyková & Lom, 1981; Davies & Ball, 1993; Molnár, 2006). In fact, there is phylogenetic evidence that coccids of terrestrial vertebrate emerged from fish coccidian strains (Rosenthal et al., 2016).

The family Calyptosporidae is represented by species with a heteroxenous life cycle, where by the oocysts are transmitted from the intermediate host, an invertebrate, to the definitive host, the fish (Overstreet et al., 1984; Whipps et al., 2012). The genus *Calyptospora* Overstreet, Hawkins and Fournie, 1984 is known to cause mainly liver pathologies, but it can also be found in the pancreas, gallbladder, mesentery, gonads and other tissues (Overstreet & Hawkins, 2017; Ramos et al., 2018; Negrão et al., 2019).

Five species are currently described in Brazil: *Calyptospora tucunarensis* (Békési & Molnár, 1991), *Calyptospora spinosa* (Azevedo et al., 1993), *Calyptospora serrasalmi* (Cheung et al., 1986), *Calyptospora gonzaguensis* (Silva et al., 2020) and *Calyptospora paranaidji* (Da Silva et al., 2019), and four of them are reported in fish from the Amazon basin. According to Da Silva et al. (2019), this region has great potential for the discovery of new calyptosporid species.

Serrasalmus rhombeus Linnaeus, 1766 stands out among the ichthyofauna of the Amazon basin. Commonly known as black or red-eyed piranha, its carnivorous habits render it notoriously aggressive. This species is part of the family Serrasalmidae, endemic to South America, usually found in northeastern Brazil and in rivers of the Amazon basin, which local communities sell as ornamental fish (Nakayama et al., 2001; Acácio et al., 2012; Sá-Oliveira et al., 2017; Anjos et al., 2018).

This paper describes the morphology of *Calyptospora* sp. and histopathological aspects of hepatic coccidiosis in *S. rhombeus*, captured in the Capim River, in the northeast of the state of Pará, eastern Amazonia.

Material and Methods

Collection and analysis of specimens

Serrasalmus rhombeus specimens were collected (under SISBIO/ICMBio Permit No. 62276-1) in the Capim River close to the “Ribeira” community (2°66'67”S, 48°32'34”W), located in the municipality of Ipixuna do Pará, in the northeastern part of the state of Pará (PA). Collection efforts extended from April 2018 to March 2019. Captured live specimens were placed in aerated plastic bags and taken to the Carlos Azevedo Research Laboratory at the Federal Rural University of Amazonia (UFRA), Belém, PA.

The fish were anesthetized using the MS-222 protocol (50 mg/L tricaine methanesulfonate) and then necropsied, as authorized by the institution's Ethics Committee on Animal Use, under Protocol No. 011/2014). A parasitology examination was performed using a stereomicroscope to search for lesions/cysts on the body surface and in the coelomic cavity, and the findings were confirmed under an ordinary light microscope (LM), using fresh slides.

Histology

Were small fragments of parasitized liver tissue were fixed in Davidson's fluid for a period of 24 hours, processed using paraffin techniques, 5 µm thick cut and stained with Hematoxylin-Eosin (HE) and Zielh-Neelsen (ZN) (Luna, 1968).

Oocyst morphometry

Mature oocysts (n=30) were measured from images captured by a Zeiss Axiocam ICc 1 camera installed in a Zeiss Axioskop 40 microscope. Means and standard deviations were measured in micrometers (µm). A morphometric comparison was made with other species described in the literature, using principal component analysis (PCA), and analyzing the following parameters: oocyst diameter (OD), sporocyst length and width (SL) and the length-to-width ratio of oocyst to sporocyst (L:W), as described by Da Silva et al. (2019) for *Calyptospora*. The hierarchical clustering method UPGMA was also adopted. Both analyses were performed using PAST 3.0 software (Hammer et al., 2001).

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Fragments of parasitized liver tissue were fixed in 5% glutaraldehyde buffered with sodium cacodylate at pH 7.2 for 12h at 4°C. They were then washed in buffer solution, fixed in 2% OsO₄ and buffered for three hours without

varying the temperature. After this, the fragments were dehydrated in increasing ethanol and propylene oxide series, coated with a thin layer of gold and photographed in a TESCAN MIRA3 FEG-SEM field emission scanning electron microscope at the Emílio Goeldi Museum in Belém, state of Pará (Brazil).

Results

Spherical oocysts, showing characteristics inherent to the genus *Calyptospora*, were found in the liver of 05 of the 15 analyzed *S. rhombeus* specimens, representing 33.0% of the specimens.

The oocysts had a diameter of 17.4 ± 1.0 (15.7-19) (Figure 1A, 2B and 3A), with four pyriform sporocysts in the shape of “bowling pins” (Figure 1B, 2A and B), 8.33 ± 1.1 (6- 10) in length and 4.29 ± 0.83 (3-4.68) in width. The oocysts, which were arranged perpendicularly and covered by a thin membranous veil-like layer, and in the internal region of the sporocysts, two sporozoites were present (Figure 1C and 3A). A suture was visible in the apical region of the external surface (Figure 2B and D, 3B), while the posterior part contained several lateral projections, the sporopods (Figure 2C, 3B). These morphological traits are characteristic of the genus *Calyptospora* (Overstreet et al., 1984).

The first two axes in the PCA, which explained 92.1% of the variance, were influenced mainly by the length-to-width ratio of oocyst to sporocyst. The *Calyptospora* sp. identified in this study was similar to *Calyptospora* sp. 4 and *C. gonzaguensis*, although this relationship was negative to the other species on both axes (Figure 4). This aspect was confirmed in the similarity dendrogram, indicating that the Euclidean distance between *Calyptospora* sp. 4 and *C. gonzaguensis* was smaller, compared to *Calyptospora* sp. (Figure 5).

The histological results revealed oocyst clusters close to blood vessels in the hepatic parenchyma (Figure 6 A – F), showing tissue degeneration, localized liver fibrosis and compression necrosis, with hepatic cells exhibiting pyknotic nuclei and lacey cytoplasm (Figure 6A and 6D). Note the presence of mononuclear cell infiltrates surrounded the oocysts, indicating a mild inflammatory process (Figure 6A and 6C), as well as melanomacrophages in both types of stains (Figure 6B and 6F).

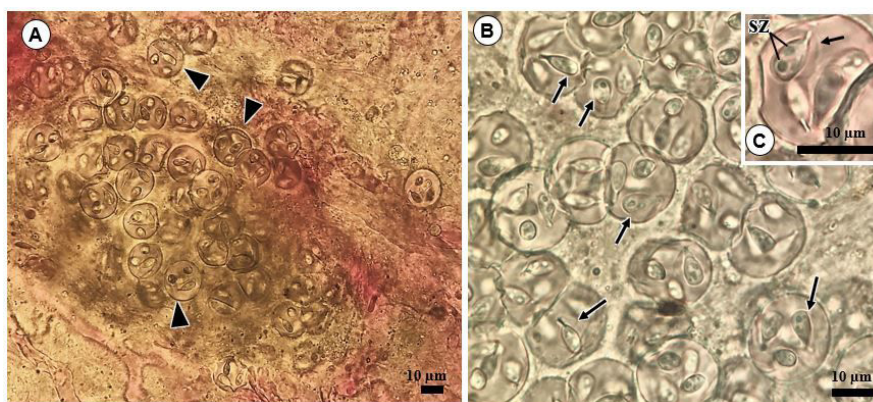


Figure 1. Light microscope images of infection by *Calyptospora* sp. in *Serrasalmus rhombeus*. A: Clusters of *Calyptospora* sp. oocysts in the liver; B: The arrowhead indicates sporocysts inside oocysts; C: Highlight of the sporocyst structure, with sporozoites (SZ) and membranous veil (arrowhead).

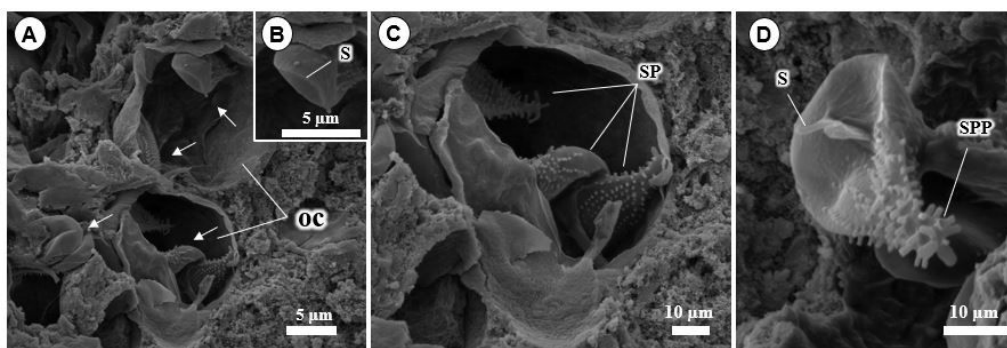


Figure 2. Scanning electron microscopy micrographs of *Calyptospora* sp. in the liver of *Serrasalmus rhombeus*. A: Oocysts (oc) composed of 4 sporocysts (arrow). B-D: Sporocyst (sp), with emphasis on the suture (s) and sporopods (spp).

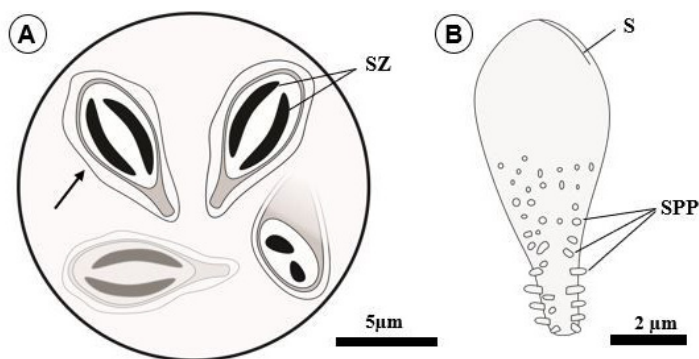


Figure 3. Schematic drawings of the oocyst and sporocyst, respectively. A: Oocyst containing 4 sporocysts, each surrounded by a membranous veil (arrow) and containing two sporozoites (sz); B: Details of the external structure of the sporocysts, with the presence of a suture (s) and sporopods (spp).

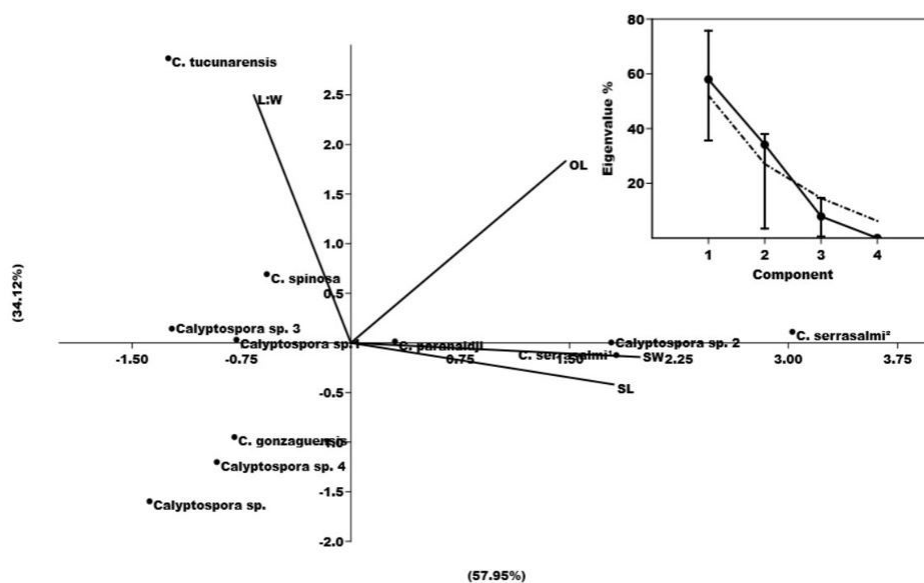


Figure 4. Principal component analysis (PCA). Oocyst length (OL); Sporocyst length (SL); length-to-width ratio of oocyst to sporocyst (L:W).

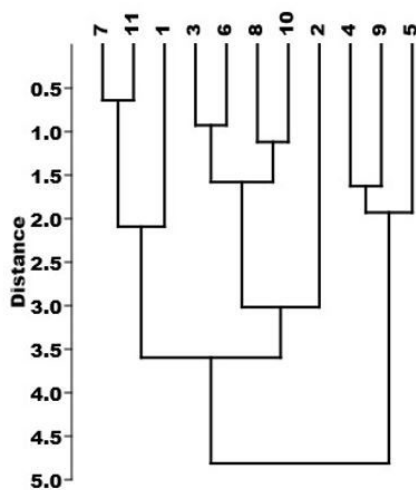


Figure 5. Dendrogram of similarity. 1- *Calyptospora* sp.; 2- *C. tucunarensis*; 3- *C. spinosa*; 4- *C. serrasalmi* ¹; 5- *C. serrasalmi* ²; 6- *C. paranaidji*; 7- *C. gonzaguensis*; 8- *Calyptospora* sp.¹; 9- *Calyptospora* sp.²; 10- *Calyptospora* sp.³; 11- *Calyptospora* sp.⁴

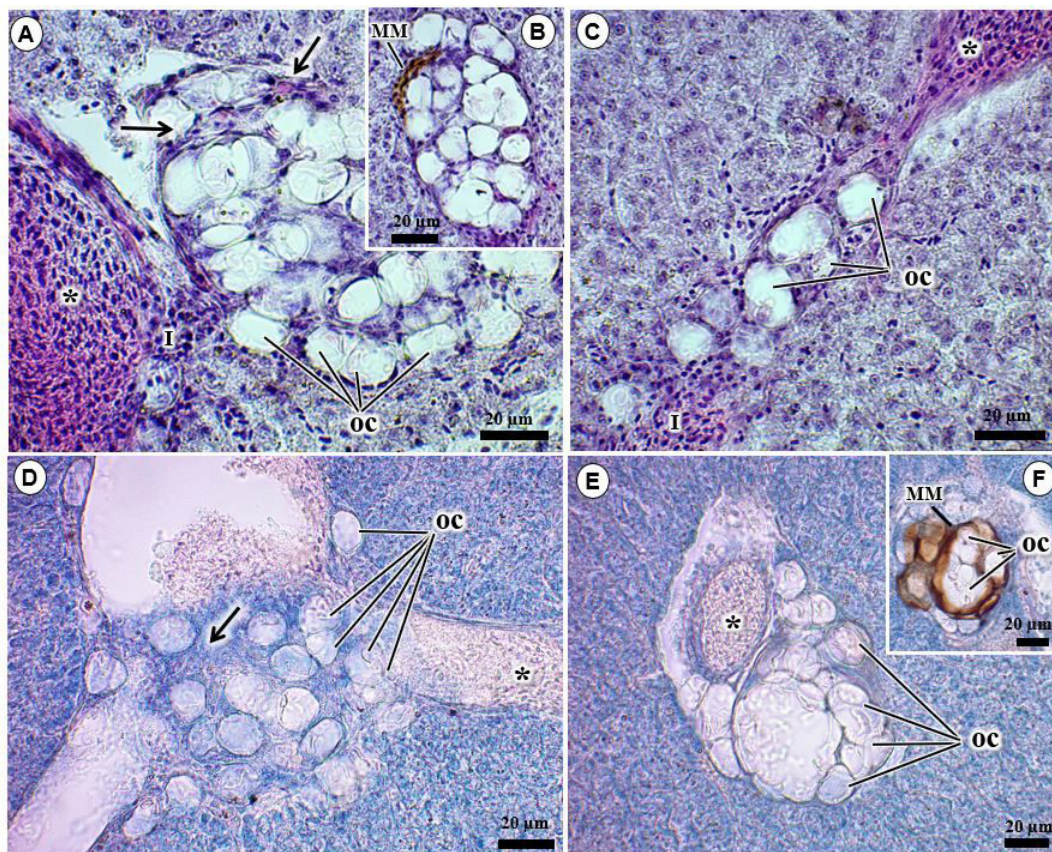


Figure 6. Histological sections of *Serrasalmus rhombeus* liver infected by *Calyptospora* sp. Oocysts (OC) disseminated in the liver tissue close to blood vessels (*), with the presence of fibroblasts (arrowhead) and mononuclear cell infiltrate (I) (6A, C and E). 6B and 6F indicate melanomacrophages (MM) around oocysts. 6D reveals widespread necrosis, liver degeneration (arrowhead), and the presence of red blood cells (*) in microphotographs of ZN stained tissue.

Discussion

The parasite prevalence rate found in this study is lower than other infections by *Calyptospora*, which were reported in *Cichla temensis* Heckel, 1840 (56.0%) (Santiago et al., 2012), *Brachyplatystoma vaillantii* Valenciennes, 1940 (60.0%) (Silva et al., 2012), *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 (63.0%) (Azevedo et al., 1993), *Cichla ocellaris* Bloch & Schneider, 1801 (100%) (Békési & Molnár, 1991) and 100% in carnivorous species collected by Negrão et al. (2019).

Calyptosporids have already been described causing liver infections in *Serrasalmus niger*, *Serrasalmus striolatus* and *S. rhombeus*, the host species in this study, presenting specificity for *Calyptospora serrasalmi* (Cheung et al., 1986; Casal et al., 2007; Whipps et al., 2012; Negrão et al., 2019). The spherical shape of oocysts, pyriform shape of sporocysts, and lateral extension of the sporopods were similar to this species. However, the morphometric comparisons showed greater proximity to *Calyptospora* sp. 4 found in *Arapaima gigas* (Bonar et al., 2006) and *C. gonzaguensis* described in *Triporthes angulatus* (Silva et al., 2020), which were particularly congruent with the diameter of the oocysts, of 19 µm and 19.6 µm, respectively (Table 1).

The histopathological examination revealed oocyst clusters in the liver parenchyma adjacent to blood vessels. This is a typical histopathological finding of *Calyptospora* and has been described in several studies (Békési & Molnár, 1991; Ramos et al., 2018; Velasco et al., 2012; Santiago et al., 2012). However, minor variations occur, with some species showing tropism only in blood vessels, as observed in *C. gonzaguensis*, or only in the liver parenchyma, such as *C. paranaidji* (Silva et al., 2020; Da Silva et al., 2019).

In more intense infections, the liver changes to a visibly lighter color (Videira et al., 2013; Velasco et al., 2012), resulting from the degeneration of liver tissue. As the oocysts proliferate, they cause inflammation and formation of granulomas coated with fibrous tissue (Ramos et al., 2018; Fournie & Overstreet, 1993; Solangi & Overstreet, 1980). According to Azevedo et al. (1993), the damage caused by *Calyptospora* becomes more evident at the cellular level, with cells adjacent to the oocysts presenting morphological changes such as hypertrophy and destruction of cytoplasmic structures. Similar results were found in this study.

Table 1. Morphometric comparison of *Calyptospora* spp. oocysts and sporocysts described in fish species from Brazil.

Species	OD	L:W	Shape	Sporocyst (µm)		CS/IS	References
				Length	Width		
<i>Calyptospora</i> sp.	17.4 (1.0)	2.1	Pyriform	8.3 (1.1)	4.3 (0.8)	Pará/Liver	This study
<i>Calyptospora tucunarensis</i>	24.3 (2.1)	2.9	Ellipsoidal	8.3 (1.3)	3.7 (1.1)	Ceará/Liver	(Békési & Molnár, 1991)
<i>Calyptospora spinosa</i>	22.3 (1.6)	2.4	Ellipsoidal	9.3 (0.4)	3.8 (0.4)	Pará/Liver, Gonads and ovary.	(Azevedo et al., 1993)
<i>Calyptospora serrasalmi</i> ¹	23.5 (2.1)	2.2	Pyriform	10.7 (1.1)	5.5 (0.5)	Amazonas and Pernambuco/Liver	(Cheung et al., 1986)
<i>Calyptospora serrasalmi</i> ²	25.4 (0.6)	2.2	Pyriform	11.7 (1)	5.9 (0.4)	Pará/Liver	(Casal et al., 2007)
<i>Calyptospora paranaidji</i>	22.1 (1.5)	2.3	Pyriform	9.7 (0.5)	4.6 (0.6)	Maranhão/Liver	(Da Silva et al., 2019)
<i>Calyptospora gonzaguensis</i>	19.6 (1.4)	2.1	Pyriform	9.2 (0.6)	3.9 (0.2)	Maranhão/Liver, gall bladder and fatty tissue	(Silva et al., 2020)
<i>Calyptospora</i> sp. 1	20.8	2.3	Pyriform	8.9	4.1	Pará/Liver	(Silva et al., 2012)
<i>Calyptospora</i> sp. 2	24.5	2.1	Ellipsoidal	11.5	4.5	Minas Gerais /Liver and Intestines	(Albuquerque & Brasil-Sato, 2010)
<i>Calyptospora</i> sp. 3	21.2	2.3	Pyriform	9.2	3.1	Manaus/ Hepatopancreas	(Santiago et al., 2012)
<i>Calyptospora</i> sp. 4	19.0	2.1	Pyriform	9	4	Brazil/ Liver	(Bonar et al., 2006)

Note: Oocyst Diameter (OD); length-to-width ratio of oocyst to sporocyst (L:W); Collection Site (CS); Infection Site (IS).

Inflammatory infiltrate and the presence of mononuclear cells surrounding the oocysts were also described by Velasco et al. (2012), Ramos et al. (2018) and Santiago et al. (2012). Melanomacrophages were also found close to oocysts. These phagocytic cells belong to the host's innate immune system and are a common cell type usually found in fish liver infections. In such infections, these cells are part of the reticuloendothelial system and their function is to eliminate pathogens that use the bloodstream to reach the target organ/tissue where their life cycle is completed (Agius, 1985; Steinel & Bolnick, 2017).

Susceptibility to parasitism, as well as the degree of pathogenicity, may depend on ecological factors, as was observed in an experiment with induced *C. funduli* infections in Atheriniformes fish, where environmental conditions and geographical isolation acted as barriers to the prevalence of parasites in each species (Fournie et al., 2000).

The histopathological data indicated that although the prevalence of parasitism by *Calyptospora* sp. was not high, significant pathological changes occurred in the host's liver tissue. These changes may give rise to functional abnormalities in the liver, threatening the host's survival in nature.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of CAPES, Brazil's Federal Agency for the Support and Improvement of Higher Education and the Federal Rural University of Amazonia – UFRA for enabling this study.

References

- Acácio M, Varella ÂMB, Malta JCO. The parasitic crustaceans of *Serrasalmus rhombeus* (Linnaeus, 1776) (Characiformes: Serrasalminidae) from floodplain lakes of the Solimões River, Central Amazon, Brazil. *Neotrop Helminthol* 2012; 6(2): 179-184.
- Agius C. The melano-macrophage centres of fish: a review. In: Manning MJ, Tatner MF. *Fish Immunology*. 1st ed. Cambridge: Academic Press; 1985. p. 85-105. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-469230-5.50011-8>.

- Anjos HDB, Amorim RMS, Siqueira JA, Anjos CR. Ornamental fish export of the State of Amazonas, Amazon Basin, Brazil. *Bol Inst Pesca* 2018; 35(2): 259-274.
- Azevedo C, Matos P, Matos E. Morphological data of *Calyptospora spinosa* n. sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) parasite of *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 (Teleostei) from Amazon River. *Eur J Protistol* 1993; 29(2): 171-175. [http://dx.doi.org/10.1016/S0932-4739\(11\)80270-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0932-4739(11)80270-1). PMID:23195539.
- Albuquerque MC, Brasil-Sato MC. First report of *Calyptospora* sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) in forage characid fish from the Três Marias Reservoir, São Francisco Basin, Brazil. *Eur J Protistol* 2010; 46(2): 150-152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejop.2009.12.005>. PMID:20163938.
- Békési L, Molnár K. *Calyptospora tucunarensis* n. sp. (Apicomplexa: Sporozoea) from the liver of tucunare *Cichla ocellaris* in Brazil. *Syst Parasitol* 1991; 18(2): 127-132. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00017665>.
- Bonar CJ, Poynton SH, Schulman FY, Rietschek RL, Garner MM. Hepatic *Calyptospora* sp. (Apicomplexa) infection in a wild-born, aquarium-held clutch of juvenile arapaima *Arapaima gigas* (Osteoglossidae). *Dis Aquat Organ* 2006; 70(1-2): 81-92. <http://dx.doi.org/10.3354/dao070081>. PMID:16875394.
- Casal G, Padovan I, Matos E, Padovan P, Matos P, Guimarães A, et al. Morphological and ultrastructural redescription of *Calyptospora serrasalmi* Cheung, Nigrelli & Ruggieri, 1986 (Apicomplexa: Calyptosporidae), a parasite found in two new host species of the genus *Serrasalmus*. *Braz J Morphol Sci* 2007; 101(1): 11-16.
- Cheung PJ, Nigrelli RF, Ruggieri GD. *Calyptospora serrasalmi* sp. nov. (Coccidia: Calyptosporidae) from liver of the black piranha, *Serrasalmus niger* Schomburgk. *J Aquaricult Aquat Sci* 1986; 4(3): 54-57.
- Da Silva MF, Da Silva DT, Giese EG, Hamoy IG, Matos E. Morphology and Phylogeny of *Calyptospora paranaidji* n. sp. (Eimeriorina: Calyptosporidae), an Apicomplexan Parasite of the Hepatic Tissue of *Cichla piquiti* Kullander & Ferreira, 2006, From a Reservoir in the Brazilian Amazon Region. *J Eukaryot Microbiol* 2019; 66(4): 608-616. <http://dx.doi.org/10.1111/jeu.12707>. PMID:30548108.
- Davies AJ, Ball SJ. The biology of fish coccidia. In: Baker JR, Muller R. *Advances in parasitology*. 1st ed. Cambridge: Academic Press; 1993. p. 293-366.
- Dyková I, Lom J. Fish coccidia: critical notes on life cycles, classification and pathogenicity. *J Fish Dis* 1981; 4(6): 487-505. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.1981.tb01161.x>.
- Fournie JW, Overstreet RM. Host Specificity of *Calyptospora funduli* (Apicomplexa: Calyptosporidae) in Atheriniform Fishes. *J Parasitol* 1993; 79(5): 720-727. <http://dx.doi.org/10.2307/3283611>. PMID:8410544.
- Fournie JW, Vogelbein WK, Overstreet RM, Hawkins WE. Life cycle of *Calyptospora funduli* (Apicomplexa: calyptosporidae). *J Parasitol* 2000; 86(3): 501-505. [http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0501:LCOFA\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0501:LCOFA]2.0.CO;2). PMID:10864246.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontol Electronic* 2001; 4(1):1-9.
- Luna LG. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw-Hill; 1968.
- Molnár K. Phylum apicomplexa. In: Woo PTK, Leatherland JF. *Fish diseases and disorders*. 2nd ed. Cambridge: Cabi; 2006. <http://dx.doi.org/10.1079/9780851990156.0183>.
- Nakayama C, Jégu M, Porto JIR, Feldberg E. Karyological Evidence for a Cryptic Species of Piranha within *Serrasalmus rhombeus* (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon. *Copeia* 2001; 2001(3): 866-869. [http://dx.doi.org/10.1643/0045-8511\(2001\)001\[0866:KEFACS\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1643/0045-8511(2001)001[0866:KEFACS]2.0.CO;2).
- Negrão MCS, Silva MRL, Videira MN, Viana LA. Prevalence and molecular characterisation of *Calyptospora* parasites Overstreet, Hawkins and Fournié, 1984 (Apicomplexa: Calyptosporidae) in fishes from the eastern Amazon, Brazil. *Parasitol Int* 2019; 73: 101975. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2019.101975>. PMID:31421267.
- Overstreet RM, Hawkins WE, Fournie JW. The Coccidian Genus *Calyptospora* n. g. and Family Calyptosporidae n. fam. (Apicomplexa), with Members Infecting Primarily Fishes. *J Protozool* 1984; 31(2): 332-339. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1984.tb02972.x>.
- Overstreet RM, Hawkins WE. Diseases and mortalities of fishes and other animals in the Gulf of Mexico. In: Ward C. *Habitats and biota of the Gulf of Mexico: Before the Deepwater Horizon oil spill*. 1st ed. New York: Springer; 2017. p. 1589-1738. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3456-0_6.
- Ramos ABMA, Santos PFS, Hemeterio LCA, Santos WJP, Araújo RS, Matos EM. Coccidiose hepática em *Aspistor quadriscutis*, Valenciennes, 1840 (Teleostei: Ariidae) capturados no estuário do nordeste paraense, Amazônia, Brasil. *Arch Vet Sci* 2018; 23(3): 63-67. <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v23i3.52244>.
- Rosenthal BM, Dunams-Morel D, Ostoros G, Molnár K. Coccidian parasites of fish encompass profound phylogenetic diversity and gave rise to each of the major parasitic groups in terrestrial vertebrates. *Infect Genet Evol* 2016; 40: 219-227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.018>. PMID:26911642.

- Santiago H, Corrêa JL, Tortelly R, Menezes RC, Matos P, Matos E. 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. *Parasitol Res* 2012; 110(6): 2569-2572. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2770-0>. PMID:22200958.
- Sá-Oliveira JC, Ferrari SF, Vasconcelos HCG, Araujo AS, Campos CEC, Mattos-Dias CAG, et al. Resource Partitioning between Two Piranhas (*Serrasalmus gibbus* and *Serrasalmus rhombeus*) in an Amazonian Reservoir. *Sci World J* 2017; 2017: 9. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/8064126>. PMID:29359177.
- Silva MC, Clemente SCS, Júnior JAP, Silva MVO, Matos ER. *Calyptospora* sp. in *Brachyplatystoma vaillantii* trapped at the Vigia, State of Pará, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 21(2): 176-178. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612012000200020>. PMID:22832762.
- Silva MF, Orlanda JFF, Araújo-Costa MJ, Hamoy I, Matos E. Hepatic coccidiosis in *Triporthes angulatus* Spix & Agassiz, 1829 (Characiformes: Triporthidae), a tropical fish from the eastern Brazilian Amazon, with the description of a new species of *Calyptospora* (Apicomplexa: Calyptosporidae). *J Eukaryot Microbiol* 2020; 67(3): 352-358. <http://dx.doi.org/10.1111/jeu.12785>. PMID:31943507.
- Solangi MA, Overstreet RM. Biology and Pathogenesis of the Coccidium *Eimeria funduli* Infecting Killifishes. *J Parasitol* 1980; 66(3): 513-526. <http://dx.doi.org/10.2307/3280757>. PMID:7391893.
- Steinel NC, Bolnick DI. Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Front Immunol* 2017; 8: 827. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.00827>. PMID:28769932.
- Velasco M, Videira M, Matos P, São Clemente SC, Sanches O, Matos E. Morfologia e nova ocorrência de um coccídio hepatopancreático parasita de peixe amazônico. *Amazon J Agric Envir Sci* 2012; 55(3): 231-235. <http://dx.doi.org/10.4322/rca.2012.063>.
- Videira M, Velasco M, Tortelly R, Menezes RC, São Clemente SC, Matos E. An anatomopathological study of hepatic coccidiosis (*Calyptospora* sp.) in the Acará-pixuna, *Aequidens plagiozonatus* Kullander, 1984 from the Brazilian state of Pará. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2013; 65(1): 91-94. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352013000100014>.
- Whipps CM, Fournie JW, Morrison DA, Azevedo C, Matos E, Thebo P, et al. Phylogeny of fish-infecting *Calyptospora* species (Apicomplexa: eimeriorina). *Parasitol Res* 2012; 111(3): 1331-1342. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-2969-8>. PMID:22645034.