



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

WEVERTON JOHN PINHEIRO DOS SANTOS

**ASPECTOS MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE MICROPARASITOS
EUCARIÓTICOS EM *Trachelyopterus galeatus* E *Trachycorystes porosus*
(SILURIFORMES: AUCHENIPTERIDAE) ORIUNDOS DOS MUNICÍPIOS DE
PEIXE-BOI E CACHOEIRA DO ARARI/MARAJÓ-PA**

**BELÉM
2019**

WEVERTON JOHN PINHEIRO DOS SANTOS

**ASPECTOS MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE MICROPARASITOS
EUCARIÓTICOS EM *Trachelyopterus galeatus* E *Trachycorystes porosus*
(SILURIFORMES: AUCHENIPTERIDAE) ORIUNDOS DOS MUNICÍPIOS DE
PEIXE-BOI E CACHOEIRA DO ARARI/MARAJÓ-PA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais: área de concentração Ecologia Aquática, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Rodrigues Matos
Co-orientador: Prof. Dr. Igor Guerreiro Hamoy

**BELÉM
2019**

Santos, Weverton John Pinheiro dos

Aspectos morfológico e molecular de microparasitos eucarióticos em *Trachelyopterus galeatus* e *Trachycorystes porosus* (Siluriformes: Auchenipteridae) oriundos dos Municípios de Peixe-Boi e Cachoeira do Arari/Marajó-Pa. / Weverton John Pinheiro dos Santos. – Belém, PA, 2019.

106 f.

Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Rodrigues Matos.

1. Anujá (*trachelyopterus galeatus* e *trachycorystes porosus*) – Peixe-Boi/Cachoeira do Arari, PA. 2. Microparasitos - Morfologia. 3. Mixosporídeos. 4. Microsporídeos. 5. Ictioparasitologia. I. Matos, Edilson Rodrigues (orient.) II. Título

CDD – 597.49098115

WEVERTON JOHN PINHEIRO DOS SANTOS

ASPECTOS MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE MICROPARASITOS
EUCARIÓTICOS EM *Trachelyopterus galeatus* E *Trachycorystes porosus*
(SILURIFORMES: AUCHENIPTERIDAE) ORIUNDOS DOS MUNICÍPIOS DE
PEIXE-BOI E CACHOEIRA DO ARARI/MARAJÓ-PA

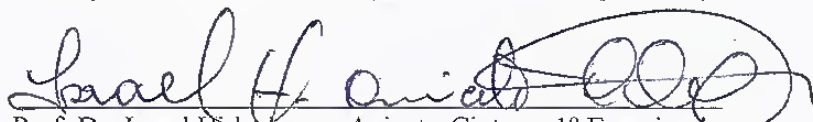
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais: área de concentração Ecologia Aquática, para obtenção do título de Mestre.

Data da Defesa: 26.02.2019

Banca Examinadora:



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



Prof. Dr. Israel Hidenburgo Aniceto Cintra – 1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA/ISARH



Prof. Dr. Moacir Cerqueira da Silva – 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA/ISPA



Prof.ª Dr.ª. Elane Guerreiro Giese – 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA/ISPA

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus, por todas as vitórias alcançadas no decorrer dos anos, me dando forças para jamais desistir;

À Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, especificamente ao PPG-AqRAT, pelo incentivo na realização de pesquisas, ofertando bolsas CAPES para auxílio no desenvolvimento do projeto, como o do presente estudo.

Aos meus queridos familiares pelo incentivo. Em especial à minha mãe Maria Raimunda, meu irmão Welton Santos e meu tio Denison Santos, que investiram e acreditaram em meus estudos. Deixo-lhes, aqui, meu profundo respeito e a minha eterna gratidão;

Ao professor Dr. Edilson Matos, pela orientação durante todo o decorrer do mestrado, conhecimentos repassados por todos os dias de convivência e ensinamentos;

A minha amiga Elideth Pacheco (Amada), que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins, tanto na vida acadêmica quanto na vida pessoal. Uma das melhores pessoas que tive a oportunidade de conhecer;

À Renata Santos (Re), grande amiga que posso contar sempre que precisar, está sempre disposta a ajudar. Um agradecimento especial por ser a autora dos mapas utilizados no trabalho e da tradução do abstract;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo (LPCA), Deborah Camilla (uma de cada), Lorena Brito (Nega), Camila Pereira, Kelly Vilela, Carlos Santana, Talyta Ferreira, Lenize Hemeterio (Kika), Diehgo Tuloza, Michele Velasco, Patrícia Matos, Flávia Cabral, e Roger Leomar, pelos momentos compartilhados, a presença de vocês no laboratório, por muitas vezes, era o que alegrava o meu dia. Agradecimento muito especial para Joyce Cardim, José Ledamir (Neto) e Patrícia Saco (Pati), por todo o momento estarem me ajudando e ensinando, sendo imprescindíveis nessa etapa da minha vida, os levarei para a vida toda;

Ao meu amigo e colega de turma Savio Guerreiro, por todos os ensinamentos (teóricos e práticos) sobre biologia molecular, e ajuda e paciência no decorrer do estágio de docência.

Ao Mrs. Douglas Aviz pela identificação das espécies de peixes do presente estudo.

A CAPES, CNPq e FAPESPA, órgãos que sempre nos auxiliaram, possibilitando a execução das coletas, trabalhos e pesquisas no LPCA.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Esta conquista tem um pouco de cada um de nós.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Distribuição da espécie da ordem Siluriformes pelos continentes. 14
- Figura 2** - Exemplar de *Trachelyopterus galeatus* em vista lateral..... 16
- Figura 3** - Exemplar de *Trachycorystes porosus* em vista lateral. 17
- Figura 4** - Desenho esquemático do ciclo de vida indireto dos mixosporídios: a) hospedeiro definitivo; b) actinosporo; c) hospedeiro intermediário; d) mixósporo..... 21
- Figura 5** - Desenhos esquemático dos diferentes gêneros de mixosporídios estudados no LPCA: a) *Henneguya rondoni*; b) *Myxobolus desaequalis*; c) *Ellipsomyxa gobiodes*; d) *Kudoa aequidens*; e) *Myxidium volitans*; f) *Tryangulamyxa amazonica* e g) *Meglitschia myleii*. 22
- Figura 6** – Desenho esquemático de esporo de *Myxobolus* sp. (vista frontal), apresentando as principais medidas morfométricas..... 23
- Figura 7** - Desenho esquemático de esporo do gênero *Kudoa aequidens* (vista frontal). 24
- Figura 8** - Desenho esquemático do esporo da espécie *Ellipsomyxa gobioides* (vista frontal), apresentando as principais medidas morfométricas. 25
- Figura 9** - Desenho esquemático de esporos de microsporídio indicando suas estruturas morfológicas. A - Esquema tridimensional do esporo; B - esquema em corte transversal do esporo. 27
- Figura 10** - Representação esquemática do ciclo de vida dos microsporídios: A - extrusão do filamento polar e fusão com a célula hospedeira; B - fase merogônia, onde ocorre a divisão dos merôntes até originar os esporontes; C - fase esporogônia, onde os esporontes se diferenciam para originar os esporoblastos, e por seguinte, os esporos..... 28
- Figura 11** - Desenhos esquemático dos diferentes gêneros de microsporídios estudados no LPCA: a) *Microsporidium brevirostris*, b) *Potasporea morhaphis*, c) *Kabatana rondoni*, d) *Potasporea aequidens*, e) Macro e micro esporo de *Pleistophora beebei*. 29
- Figura 12** - Localização geográfica do Município de Peixe-Boi, na Mesorregião Nordeste do Pará. 34
- Figura 13** - Localização geográfica do Município de Cachoeira do Arari - Marajó. 35
- Figura 14** - Local de coleta dos exemplares no Município de a) Peixe-Boi e b) Cachoeira do Arari - Marajó. 35
- Figura 15** - a) Exemplares em baldes com água do habitat após captura; b) Aquários onde os espécimes são mantidos ao chegarem no LPCA. 36
- Figura 16** - Análise de exemplar por meio de estereomicroscópio, com finalidade de verificar indícios de parasitismo na sua cavidade celomática e órgãos internos. 37

Figura 17 – Fotomacrografia: a) Brânquias de *T. galeatus* apresentando cistos esbranquiçados. Barra de escala: 500 µm; Fotomicrografia: b) Observação à fresco do cisto (*) presente no filamento branquial. Barra de escala: 100 µm; c) Esporos maduros de *Myxobolus* sp. (cabeça de seta), evidenciando as cápsulas polares (CP). Barra de escala: 20 µm.....42

Figura 18 - Fotomicrografia: a) Cisto de *Myxobolus* sp. (cabeça da seta) entre os filamentos branquiais corado em HE; b) Cisto de *Myxobolus* sp. corado em ZN (cabeça da seta), com destaque de imagem do esporo com as duas cápsulas polares evidenciadas. Barras de escala: 50 µm.....45

Figura 19 - Fotomicrografia: a) Observação a fresco de plasmódios dispóricos arredondados (cabeça da seta) dispersos no líquido da vesícula biliar dos exemplares. Barra de escala: 50 µm; b) DIC de Plasmódio rompido com esporo no seu interior. Barra de escala: 05 µm; c) Esporo maduro de *Ellipsomyxa* sp. próximo a parede da vesícula biliar (cabeça da seta), evidenciando o numero de voltas do filamento polar. Barra de escala: 05 µm; d) Esporos maduros de *Ellipsomyxa* sp. dispersos no líquido no líquido vesical, evidenciando as cápsulas polares (CP). Barra de escala: 20 µm.46

Figura 20 - Fotomicrografia: a) Plasmódio de *Ellipsomyxa* sp. (cabeça da seta) na parede (P) da vesícula biliar, corado em HE; b) Esporos de *Ellipsomyxa* sp. soltos na vesícula com as cápsulas polares marcadas (CP), corado em ZN; c) Plasmódio dispóricos (cabeça da seta) presente no líquido da vesícula biliar, corado em ZN. Barras de escala: 10 µm.....49

Figura 21 - Fotomicrografia: a) Pseudocisto nas fibras da musculatura esquelética (cabeça da seta) do hospedeiro. Barra de escala: 100 µm; b) Pseudocisto rompido (*) liberando inúmeros esporos de *Kudoa* sp. na musculatura. Barra de escala: 50 µm; c) DIC de *Kudoa* sp. livres na musculatura estriada do hospedeiro analisado (cabeça da seta); d) Esporos maduros de *Kudoa* sp. vista lateral (cabeça da seta) e apical evidenciando as cápsulas polares (CP). Barras de escala: 05 µm.....50

Figura 22 - Fotomicrografia: Pseudocisto de *Kudoa* sp. (cabeça da seta) na musculares estriada esquelética, ocasionando deformidade entre as fibras musculares (fm) do hospedeiro, corado em HE; b) Observação de pseudocisto de *Kudoa* sp. (*) entre fibras musculares (fm) em corte longitudinal, corado em ZN; c) Pseudocisto (cabeça da seta) entre fibras musculares (fm) em corte transversal, corado em ZN. Barras de escala: 20 µm.....53

Figura 23 – Fotomacrografia: a) Cisto esbranquiçado de microsporídeo (cabeça da seta). Barra de escala: 200 µm; Fotomicrografia: b) Cisto arredondado de microsporídeo (*) apresentando parede espessa. Barra de escala: 10 µm. c) Cisto rompido após compressão entre lâmina e lamínula (C). Barra de escala: 50 µm; d) Inúmeros esporos piriformes de microsporídeo livres após rompimento do cisto mostrando vacúolo posterior translúcido (cabeça da seta), com detalhe em DIC. Barra de escala: 05 µm.....54

Figura 24 – Fotomicrografia: a) Cisto de microsporídeo (*) próximo as fibras musculares (fm) e tecido conjuntivo (tc), corado em HE. Barra de escala: 50 µm; b) Cisto (cabeça da seta) localizado entre fibras musculares (fm) e tecido conjuntivo (tc), corado em ZN. Barra de escala: 100 µm; c) Cisto (cabeça da seta) presente entre as fibras musculares de *T. porosus*. Barra de escala: 50 µm.57

LISTA DE ABREVIATURAS

BM – Biologia Molecular

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CP – Cápsula Polar

FAPESPA - Fundação Amazônica de Amparo a Pesquisa

HE - Hematoxilina e Eosina

LAPEM - Laboratório de Pesquisa Edilson Matos

LGA - Laboratório de Genética Aplicada

LPCA - Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

ML - Microscopia de Luz

PVE - Programa Pesquisador Visitante Especial

UFPA - Universidade Federal do Pará

UFRA - Universidade Federal Rural da Amazônia

ZN – ZIEHL-NEELSEN

RESUMO

A região amazônica apresenta uma grande riqueza de espécies exploradas pela pesca artesanal, que normalmente é realizada pela população tradicional existente na região, e no estado do Pará não é diferente, pois essa atividade possui importância para subsistência familiar. As espécies de peixes que possuem importância para a alimentação familiar, estão sujeitas a ação de diversos parasitos, dentre os quais encontramos os pertencentes ao subfilo Myxozoa e o filo Microsporidia, atuando em diversos órgãos e tecidos, causando patologia aos mesmos. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo descrever as características morfológicas e moleculares dos microparasitos encontrados em *Trachycorystes porosus* e *Trachelyopterus galeatus* capturados nos municípios de Peixe-Boi e Cachoeira do Arari/Marajó – PA. Os espécimes foram coletados bimestralmente, com auxílio de apetrechos de pesca, transportados vivos até o Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo – UFRA/Belém, anestesiados, necropsiados e seus órgãos analisados. Pequenos fragmentos dos órgãos parasitados foram retirados, fixados e processados para Microscopia de Luz (ML), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e de Varredura (MEV), e Biologia Molecular (BM). A partir das observações feitas foram encontrados dois grupos de parasitos: Myxozoa e Microsporidia. Nos exemplares de *T. galeatus*, de ambos os municípios, observou-se a presença de *Myxobolus* sp. nos filamentos branquiais, *Ellipsomyxa* sp. na vesícula biliar, *Kudoa* sp. e microsporídeo na musculatura; já em *T. porosus* foram encontrados apenas a presença de *Kudoa* sp. e microsporídeo na musculatura dos exemplares analisados. Para *Kudoa* encontrado em *T. galeatus* provenientes de Cachoeira do Arari, foi realizada análise filogenética, constatando ser a espécie *K. orbicularis*, sendo este o primeiro registro dessa espécie no hospedeiro da ordem Siluriformes. Os resultados encontrados demonstram importantes contribuições para o estudo dos ictioparasitos e do estado sanitário dos peixes da região amazônica.

Palavras-chave: Anujá. Parasitos. Mixosporídios. Microsporídios.

ABSTRACT

The Amazon region presents a great wealth of species exploited by artisanal fishing, which is usually carried out by traditional population in a region, and in the state of Pará is not different, since this activity is important for subsistence family. The species of fishes are important for family nutrition are subject to the action of several parasites, among which find those belonging to sub-Myxozoa and phylum Microsporidia, acting in various organs and tissues, causing pathology to them. The present study aimed to describe the morphological and molecular characteristics of the microparasites found in *Trachycorystes porosus* and *Trachelyopterus galeatus* captured in municipalities of Peixe - Boi and Cachoeira do Arari / Marajó - PA. The specimens were collected bimonthly, with the aid of fishing gear, transported live until the Carlos Azevedo Research Laboratory - UFRA / Belém, after were anesthetized, necropsied and their organs analyzed. Small fragments of parasitized organs were removed, fixed and processed for Light Microscopy (ML), Transmission Electron Microscopy (TEM) and Scanning (SEM), and Molecular Biology (MB). From the observations made, two groups of parasites were found: Myxozoa and Microsporidia. In specimens of *T. galeatus*, both municipalities, the presence of *Myxobolus* sp. in gill filaments, *Ellipsomyxa* sp. in gallbladder, *Kudoa* sp. and microsporidium in the musculature; already in *T. porosus* were found only the presence of *Kudoa* sp. and microsporidium in a musculature of the analyzed specimens. To *Kudoa* found in *T. galeatus* from Cachoeira do Arari, a phylogenetic analysis was carried out, evidencing the species *K. orbicularis*, being the first record of this species in the host of the order Siluriformes. The results showed important contributions for study of ichthyoparasites and health status of the fishes of Amazon region.

Keywords: Anujá. Parasites. Mixosporides. Microsporidia.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Ordem Siluriformes	14
2.2	Família Auchenipteridae	15
2.3	Sistemática dos hospedeiros	16
2.3.1	<i>Trachelyopterus galeatus</i> (Linnaeus, 1766)	16
2.3.2	<i>Trachycorystes porosus</i> (Eigenmann e Eigenmann, 1888).	17
2.4	Ictioparasitologia	17
2.5	Microparasitos	19
2.5.1	Filo Cnidaria - Subfilo Myxozoa (Grassé, 1970).....	19
2.5.1.1	Gênero <i>Myxobolus</i> (Bütschli, 1882)	22
2.5.1.2	Gênero <i>Kudoa</i> (Meglitsch, 1947)	24
2.5.1.3	Gênero <i>Ellipsomyxa</i> (Køie, 2003)	25
2.5.2	Filo Microsporidia (Balbiani, 1882).....	26
2.6	Uso da Biologia Molecular na Ictioparasitologia	29
2.7	Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Varredura	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo Geral	33
3.2	Objetivos Específicos	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Área de Estudo	34
4.2	Captura dos Espécimes	35
4.3	Eutanásia para colheita dos órgãos parasitados dos exemplares	36
4.4	Microscopia de Luz	37
4.5	Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Varredura	38
4.6	Biologia Molecular	39
4.7	Análise dos Parâmetros da Água	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	<i>Myxobolus</i> sp. parasitando as brânquias de <i>T. galeatus</i>	41
5.2	<i>Ellipsomyxa</i> sp. parasitando a vesícula biliar de <i>T. galeatus</i>	46
5.3	<i>Kudoa</i> sp. na musculatura de <i>T. galeatus</i> e <i>T. porosus</i>	50

5.4	Microsporídio na musculatura de <i>T. galeatus</i> e <i>T. porosus</i>	54
5.5	Análise dos parâmetros abióticos da água	59
6	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO	81
	APÊNDICE	86

1. INTRODUÇÃO

A atividade da pesca é realizada por uma vasta quantidade de brasileiros ao longo de todo o território nacional, direta ou indiretamente, sendo responsável pela produção do pescado, que é visto como um importante gênero alimentício com alto nível proteico para a população, e apresentando importância socioeconômica por se tornar fonte de geração de renda para milhões de famílias em todo o Brasil (RAINHA, 2014; GASALLA; YKUTA, 2015).

Na Região Amazônica, a pesca artesanal se faz bastante presente na vida da população ribeirinha que exploram os mais diversos corpos d'água, como a calha dos rios, igarapés, lagos e canais de várzea, pois o pescado é visto como importante fonte de alimento, além da pesca deste recurso gerar emprego e renda para essas famílias que vivem na região (FABRÉ; ALONSO, 1998; BARTHEM, 1999; BORCEM et al., 2011; DORIA et al., 2012; ZACARDI, 2015).

A bacia Amazônica, considerada a maior bacia fluvial do planeta com seus 5,7 milhões de km² de área (3,9 milhões em solo brasileiro) abriga uma grande diversidade de espécies de peixes (ISAAC, 2010; SAMPAIO, 2012). Nessa ictiofauna, a maior parte é constituída por Characiformes, Siluriformes, Perciformes e Gymnotiformes, dentre os quais, os Siluriformes, formam o grupo de peixes mais diversificados, tanto na sua forma como nos seus hábitos de vida (FINK; FINK, 1978; REIS et al., 2003; FUENTES; RUMIZ, 2008).

Os Siluriformes são um grupo monofilético que apresenta ampla distribuição geográfica, com ocorrência em todos os ambientes de água doce do mundo, concentram-se principalmente nas regiões tropicais e neotropicais, e também apresentando espécimes de água salobra, conhecidos popularmente no Brasil como cascudos, mandis, bagres e catfishes (MARIGUELA, 2006; NELSON, 2006).

Dentro da ordem Siluriformes encontra-se a família Auchenipteridae, que possui 20 gêneros e aproximadamente 90 espécies, que apresenta 82% delas encontradas em águas continentais brasileiras, conhecidas como carataí, fidalgo, mandubé, palmito, judeu, ximbé, cangati e cachorro-de-padre, e dentro desta família estão as espécies dos gêneros *Trachelyopterus* e *Trachycorystes* (FERRARIS-JR, 2007).

Os peixes, por sua vez, são vulneráveis a um grande número de parasitos taxonomicamente diferentes, que apresentam padrões distintos de infecção parasitária conforme seu habitat e hábito alimentar, podendo, desta forma, causar alterações no hábito de vida de seus hospedeiros, influenciando sua capacidade de competição, relação predador-

presa, desempenho de natação, escolha de parceiro e comportamento sexual (EDEMA et al., 2008; TAKEMOTO et al., 2009; SILVA et al., 2011; GOMIERO et al., 2012).

Por viverem no meio aquático os peixes apresentam os maiores índices de infecção por parasitos, pois o ambiente em que vivem facilita a propagação, reprodução, complementações do seu ciclo de vida, entre outros fatores importantes para a sobrevivência dos parasitos, e estes podem ser potencialmente prejudiciais aos seres humanos (MALTA, 1984; KEELING; FAST, 2002; MATOS, 2007).

Eiras (2004) cita que a presença, prevalência e a intensidade da parasitose nos hospedeiros variam conforme a época do ano, pois, muitas vezes, o ciclo de vida dos parasitos é dependente de mudanças climáticas e sazonais na região em que é encontrado.

A partir disto, pode-se afirmar que todas as espécies de peixes apresentam pelo menos uma espécie de parasito, e dentre os parasitos que ocorrem em organismos aquáticos, estão os pertencentes ao subfilo Myxozoa e ao filo Microsporidia, os quais contribuem com grande parte dos microrganismos causadores de doenças em peixes (MATOS et al., 2001; LOM; DYKOVÁ, 2006; TAKEMOTO et al., 2004).

Estes microparasitos de organismos aquáticos (mixosporídios e microsporídios) possuem uma diversidade de grupos com potencial patogênico, com algumas espécies tendo merecido destaque por parte de vários pesquisadores (FEIJÓ et al., 2008; FERGUSON et al., 2008; AZEVEDO et al., 2009), inclusive podendo causar toxinfecções em humanos (KAWAI et al., 2012).

Os Myxozoa são cnidários eucariotos microscópicos que infectam invertebrados e vertebrados marinhos e dulcícolas; apresentam mais de 2.300 espécies descritas, onde somente algumas são conhecidas por causar sérias ou fatais infecções, uma vez que tanto os parasitos quanto seus hospedeiros estão adaptados um ao outro (KENT et al., 2001; VITA et al., 2003; LOM; DYKOVÁ, 2006; BARTHOLOMEW et al., 2008).

Os representantes do filo Microsporidia são organismos eucariontes unicelulares, parasitos intracelulares obrigatórios, formadores de esporos, com aproximadamente 1.200 espécies, as quais estão presentes em alguns grupos de invertebrados e em todas as cinco classes de vertebrados (AZEVEDO; MATOS, 2002; FRANZEN, 2004; DIDIER, 2005; KEELING; FAST, 2002; MAGALHÃES et al., 2006).

Os estudos voltados ao conhecimento da fauna parasitária, bem como, o entendimento da relação hospedeiro-parasito-ambiente, se mostram de grande relevância para verificar e determinar a dispersão de parasitos que causam desequilíbrio nos ecossistemas, e permitir

uma identificação geral e específica, principalmente em virtude da importância econômica que algumas espécies de peixes apresentam na pesca extrativista e na aquicultura (AZEVEDO; MATOS, 2003b; LOPES, 2006). Contudo, estudos não devem ser direcionados apenas para as espécies de peixes de importância econômica, mas também para as demais, devido a importância biológica que apresentam (EIRAS et al., 2011).

De acordo com Pavanelli et al. (2002) os estudos de identificação parasitária são importantes para conhecer as possíveis patologias que ocorrem em seus hospedeiros, podendo servir como bioindicadores e avaliador para o potencial zoonótico de certas espécies de parasitos (LUQUE et al., 2004). Diversos estudos como esses vêm sendo realizados no mundo no decorrer dos anos (APPELTANS et al., 2012; PAVANELLI et al., 2013).

2. REVISÃO DE LITERATURA

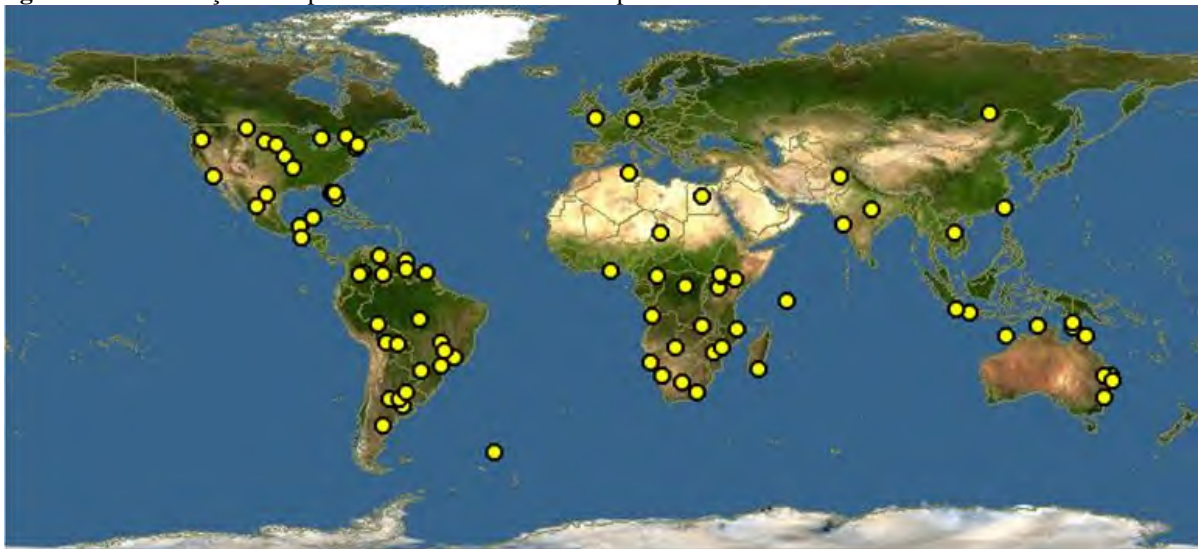
Nos ecossistemas dulcícolas, observa-se que os peixes apresentam uma maior diversidade, uma vez que apresenta, cerca de 40% das espécies descritas, e tal diversidade é derivada do isolamento geográfico das bacias hidrográficas, quando comparadas ao oceano, pois a mesma acarreta uma taxa de especiação alta (BUCKUP, 1998; HELFMAN, 2007).

No Brasil, a fauna de peixes pertencentes as famílias exclusivas de água doce é muito mais diversa, quando comparada a fauna pertencente às famílias com representação marinha. Na bacia Amazônica encontra-se a maior diversidade de peixes de água doce do mundo, apresentando as ordens Siluriformes e Characiformes como as mais representativas em número de espécies (MENEZES et al., 2003; BUCKUP et al., 2007; LÉVÊQUE et al., 2008).

2.1 Ordem Siluriformes

A ordem Siluriformes é constituída pelos peixes mais diversos morfologicamente, possuindo aproximadamente 36 famílias, 478 gêneros e mais de 3.000 espécies. Estão presentes em todos os continentes, concentrando-se principalmente nas regiões tropicais e neotropicais (Figura 1), onde ocorrem aproximadamente 1.700 espécies, podendo ser encontrados nos mais diversos habitats aquáticos, havendo predominância em água doce (MARIGUELA, 2006; FERRARIS-JR, 2007; MURIEL-CUNHA, 2008; ALBERT; REIS, 2011).

Figura 1 - Distribuição da espécie da ordem Siluriformes pelos continentes.



Fonte: <http://www.discoverlife.org>.

Os Siluriformes possuem características morfológicas distintas, tais como corpo nu envolto por pele espessa (origem do nome “peixes de couro”) ou podendo ser cobertos total ou parcialmente por placas ósseas, três pares de barbilhões, o primeiro raio da dorsal e das peitorais modificados em espinhos rígidos, havendo algumas espécies apresentando nadadeira adiposa, as vezes muito longa, além de hábito bentônico (BRITSKI et al., 1999; BRITSKI et al., 2007).

Do ponto de vista ecológico, os Siluriformes se diferem da maioria dos peixes de água doce por apresentarem o hábito predominantemente noturno, pois não são dependentes essencialmente da visão, mas sim de outros sistemas sensoriais elaborados, como os barbilhões táteis e quimiosensíveis e/ou órgãos olfativos desenvolvidos, sendo então considerados pré-adaptados à viverem no fundo de rios, cavernas e aquíferos (LUNDBERG; FRIEL, 2003).

No Brasil, essa ordem constitui cerca de 40% das espécies presentes, sendo mais de 1.000 espécies distribuídas em 11 famílias e mais de 200 gêneros. Dentre essas famílias, encontramos a Auchenipteridae, a qual é restrita à região Neotropical, compreendendo 118 espécies distribuídas em duas subfamílias, a Centromochlinae e a Auchenipterinae, esta última com 23 gêneros (PINNA, 1998; BUCKUP et al., 2007; ESCHMEYER; FONG, 2018).

2.2 Família Auchenipteridae

Os peixes da família Auchenipteridae encontram-se amplamente distribuídos pela América do Sul e América Central. Espécies, comumente chamadas de carataí, mandubé, fidalgo, cangati, cachorro-de-padre, plamito, ximbé e judeu, possuem hábitos alimentares diversificados, ingerindo frutas e sementes ou possuindo preferência por insetos e crustáceos (PINNA, 1998; FERRARIS-JR, 2003; BIRINDELLI, 2014).

Nesta família, as espécies são de pequeno a médio porte, caracterizam-se pelo corpo coberto apenas por pele, com região dorsal do corpo, entre a cabeça e a origem da nadadeira dorsal, coberta com placas ósseas suturadas entre si e com limites bem evidentes externamente; com escudo pré-dorsal fortemente unido ao crânio; nadadeira adiposa diminuta; dois ou três pares de barbilhões e abertura branquial pequena (FERRARIS-JR, 2003; GOULDING et al., 2003; BRITSKI et al., 2007).

Segundo Goulding et al. (2003), a maioria dessas espécies apresentam hábito crepuscular ou noturno, durante o dia permanecem escondidos em fendas, buracos ou debaixo

de troncos e galhos. As espécies com maior porte apresentam importância econômica, constituindo parcela na pesca comercial e de subsistência, sendo bastante comuns em lagos, e algumas de menor porte são utilizadas na aquarioria (FERRARIS-JR, 2003; GRAÇA; PAVANELLI, 2007).

Os auchenipterídeos são endêmicos dos Neotrópicos, apresentam dimorfismo sexual, com características secundárias, sendo talvez os únicos silurídeos com fertilização interna através de inseminação, e, algumas espécies apresentam a nadadeira anal transformada em um gonopódio utilizado para cópula, porém vale ressaltar que pouco se conhece em relação a biologia da maioria das espécies dessa família (PINNA, 1998; FERRARIS-JR, 2003; BIRINDELLI, 2014).

2.3 Sistemática dos hospedeiros

Abaixo a classificação taxonômica da espécie de acordo com o site Itis.gov (2019).

2.3.1 *Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus, 1766)

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Superclasse	Osteichthyes
Classe	Actinopterygii
Infraclasse	Teleostei
Ordem	Siluriformes
Família	Auchenipteridae Bleeker, 1862
Gênero	<i>Trachelyopterus</i> Valenciennes, 1840
Espécie	<i>T. galeatus</i> (Linnaeus, 1766) (Fig. 2)

Figura 2 - Exemplar de *Trachelyopterus galeatus* em vista lateral.



Fonte: LPCA, 2019.

2.3.2 *Trachycorystes porosus* (Eigenmann e Eigenmann, 1888).

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Superclasse	Osteichthyes
Classe	Actinopterygii
Infraclasse	Teleostei
Ordem	Siluriformes
Família	Auchenipteridae Bleeker, 1862
Gênero	<i>Trachycorystes</i> Bleeker, 1858
Espécie	<i>T. porosus</i> (Eigenmann e Eigenmann, 1888) (Fig. 3)

Figura 3 - Exemplo de *Trachycorystes porosus* em vista lateral.



Fonte: LPCA, 2019.

2.4 Ictioparasitologia

Os organismos patogênicos estão presentes nos mais diversos tipos de ecossistemas, envolvendo-se em diferentes teias alimentares, e em todos os níveis tróficos, pois a maioria das espécies de vertebrados podem vir a ser hospedeiros de uma ou mais espécies de parasitos (LAGRUE et al., 2011).

A ictioparasitologia é uma ciência que auxilia o entendimento das interações entre os peixes e seus parasitos (MACHADO et al., 1996). Estudos relacionados à parasitologia e patologia de peixes possuem grande importância, e vem crescendo no contexto mundial (SÃO CLEMENTE et al., 2001).

Os peixes, sejam oriundos de ambiente natural ou de pisciculturas, podem ser hospedeiros de uma grande diversidade de organismos patógenos, podendo ter o comportamento e desenvolvimento influenciados, deste modo, interferindo na resistência do

mesmo a fatores estressantes, os tornando suscetíveis a infecções bacterianas, ocasionando a perda da produtividade, do valor e da qualidade do pescado (EIRAS, et al., 2004; WOO, 2006; MILANIN, 2011).

De acordo com Kubitza e Kubitza (2004) são vários os mecanismos de transmissão de patógenos e parasitos para os peixes, pois o ambiente aquático por ser, de certo modo, bastante homogêneo, e essa característica facilita tanto a propagação quanto a distribuição desses organismos. Estes parasitos podem viver na superfície ou dentro dos seus hospedeiros, sendo usualmente divididos em endoparasitos e ectoparasitos, além de apresentarem ou não especificidade parasitária (THATCHER, 1991; PAVANELLI et al., 2002).

O processo de transmissão mais comum do parasito é via oral, porém a autoinfestação pode também acontecer mais esporadicamente (LOM; DYKOVÁ, 1992; MATOS; CORRAL; AZEVEDO, 2003). Quando os parasitos apresentam ciclos de vida mais simples utilizam apenas um hospedeiro (ciclo direto ou monóxeno), quando complexos, dependem da presença de uma variedade de hospedeiros intermediários (invertebrados ou vertebrados), hospedeiros paratênicos (que apenas transportam o parasito) e definitivos dentro do ecossistema para sua transmissão (ciclo indireto ou heteróxico) (MARCOGLIESE; CONE, 1997; PAVANELLI et al., 2002).

Existem vários fatores que podem influenciar a composição da fauna parasitária dos peixes, como alimentação, sexo do hospedeiro, parâmetros físicos e químicos da água, densidade de estocagem dos peixes (no caso de pisciculturas), entre outros (PAVANELLI et al., 2002; MADI; UETA, 2012). Segundo Bell e Burt (1991) o hábito alimentar do hospedeiro certamente é um dos fatores que mais influenciam no processo de formação da fauna parasitária.

Ferre (2001) descreve que a presença de parasitos é relativamente frequente no pescado de água doce e salgada, ocasionando diversas consequências relacionadas, principalmente, com aspectos econômicos e sanitários, pois alguns parasitos podem provocar alta mortalidade nas espécies de peixes, além de causar lesão tecidual levando a perda econômica.

Devido os parasitos, por muitas vezes, serem os causadores de problemas de saúde pública na população, que se infecta pelo consumo de pescado cru ou cozido inadequadamente, pesquisadores e autoridades sanitárias do mundo inteiro vêm dando mais atenção as zoonoses transmitidas por pescado parasitado (OKUMURA et al., 1999), tornando-

se o conhecimento da ação do parasito mais frequente quando a espécie hospedeira apresenta algum interesse econômico (MATOS et al., 1999).

Os parasitos desempenham um papel-chave nos ecossistemas, regulando a abundância ou a densidade das populações hospedeiras, estabilizando as cadeias alimentares e a estrutura das comunidades animais (ZRNCIC et al., 2009; AZEVEDO et al., 2011e). Por isso, o estudo de parasitos é de grande relevância para compreender os papéis dos mesmos no ecossistema, bem como, para desenvolver melhores medidas de conservação da biodiversidade, conhecer o impacto da sua ação em pisciculturas e das zoonoses transmitidas pelos parasitos de peixe (LUQUE et al., 2016).

Os peixes podem ser parasitados por um grande número de espécies pertencentes a filos distintos e entre organismos que podem ser considerados agentes etiológicos de doenças no pescado, estão os vírus, as bactérias, os protozoários, os fungos e os metazoários, desses últimos, ganha-se destaque os representantes do grupo Microsporidia e Myxozoa, respectivamente (EIRAS, 1994; LOM; DYKOVÁ, 2006; PAVANELLI et al., 2008; WOO, 2006; WOO et al., 2003).

2.5 Microparasitos

2.5.1 Filo Cnidaria - Subfilo Myxozoa (Grassé, 1970)

Os mixozoários pertenciam anteriormente ao reino Protista, porém no decorrer dos anos tal classificação passou a ser questionada, devido ao fato dos esporos serem multicelulares e apresentarem estruturas como as cápsulas polares, que se assemelham ao nematocisto (estrutura pungente em cnidários), além do mais, as análises filogenéticas realizadas utilizando o gene 18S rDNA confirmaram que os mesmos agrupam-se dentro de reino Metazoa (SMOTHERS et al., 1994; SIDDAL et al., 1995; CAVALIER-SMITH, 1998).

Segundo Shpirer et al. (2014) os mixozoários apresentam uma diversa disposição de genes que, taxonomicamente, são restritos ao filo Cnidaria, e a caracterização desses genes fornece evidências convincentes de que as cápsulas polares e nematocistos, são de fato estruturas homólogas e que os mixozoários são altamente originados dos cnidários, sendo desta forma, o Myxozoa considerado um subfilo (FIALA et al., 2015; OKAMURA et al., 2015).

Os Myxozoa (Animalia; Cnidaria) são endoparasitos que podem ser encontrados infectando vários tecidos, podendo apresentar uma alta especificidade tanto para os

hospedeiros quanto para os órgãos que parasitam, desenvolvem-se em forma de cistos ou plasmódios, podendo ocasionar compressão dos tecidos de seus hospedeiros (EIRAS, 1994; BÉKÉSI et al., 2002; FEIST; LONGSHAW, 2006).

Este subfilo é formado por duas classes, Malacosporea Canning et al., 2000 e Myxosporea Buetschli, 1881, possuindo mais de 2.300 espécies descritas agrupadas em 16 famílias, sendo a maioria parasitos de peixes, tanto de ambiente natural como de sistemas de criações, com algumas espécies responsáveis por ocasionar doenças com importante impacto que geram altas taxas de mortalidade em todo o mundo (KENT et al., 2001; LOM; DYKOVÁ, 2006, BARTHOLOMEW et al., 2008; MORRIS, 2010).

A classe Malacosporea agrupa os microparasitos que infectam os briozoários de água doce durante ao menos uma vez no seu ciclo de vida, possuindo apenas uma ordem, a Malacovalvulida, que agrupa as espécies dos gêneros *Buddenbrockia* e *Tetracapsuloides*. Já a classe Myxosporea está dividida em duas ordens, Bivalvulida Schulman, 1959, que são aqueles que possuem o esporo com duas valvas e uma a quatro cápsulas polares; e Multivalvulida Schulman, 1959, que são aqueles que possuem três a sete valvas e duas a sete cápsulas polares (TOPS; CURRY; OKAMURA, 2005).

Dentro da classe Myxosporea, os mixozoários compreendem mais de 2.180 espécies e estão divididos em 62 gêneros, são parasitos microscópicos, unicelulares e formadores de esporos, comumente encontrados em peixes na região das brânquias, órgãos internos e na musculatura, onde formando cistos que contêm numerosos esporos, podendo também infectar répteis e anfíbios, dentre as espécies, três gêneros são as mais comuns em peixes marinhos e de água doce, sendo eles *Myxobolus*, *Henneguya* e *Kudoa* (LOM; DYKOVÁ, 2006; GRIFFIN et al., 2008; ATKINSON, 2011; LUQUE, 2014).

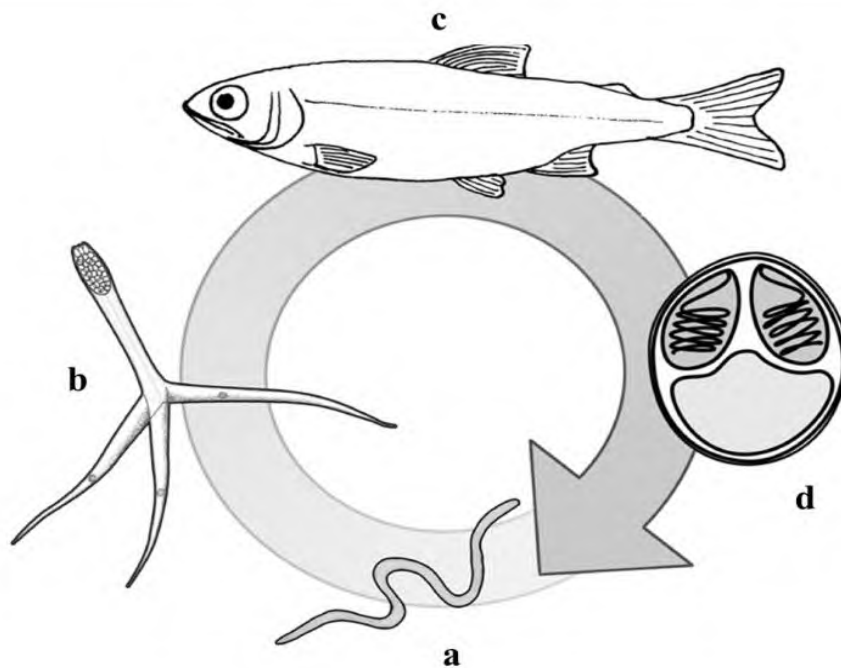
Em sua morfologia, os microparasitos desse grupo se diferenciam dos demais pela presença de cápsulas polares, além da presença de um ou mais esporoplasmas no interior dos esporos, que são as células infectantes e possuem forma amebóide (EIRAS, 1994; ATKINSON, 2011). Segundo Matos (2001) a maior diferença morfológica dentre os mixosporídios ocorre nas valvas, mas outras características são utilizadas para a diferenciação das espécies, como tamanho das cápsulas polares, número de voltas dos tubos polares, entre outras.

Quando parasitos de peixes, esses organismos são endoparasitos, infectando qualquer tecido ou órgão do corpo de seus hospedeiros sendo mais comum na bexiga natatória, vesícula biliar, cérebro e brânquias, podendo ser histozóicos (intracelular ou intercelular) ou celozóicos

(cavidade dos órgãos) (LOM, 1969; VIEIRA, 2016). No entanto, as espécies de mixosporídios apresentam alto grau de tropismo, tanto para o hospedeiro, como para os tecidos infectados (SALIM; DESSER, 2000).

O seu ciclo de vida é de forma indireta, apresentando duas fases, sendo a primeira no peixe, que é o hospedeiro intermediário e a segunda no anelídeo, que é o hospedeiro definitivo, envolvendo um mixosporo e um actinosporo neste ciclo. A fase mais conhecida é a de mixosporos, sendo encontrados geralmente em peixes, já a fase de actinosporos envolve um processo sexual, quase que exclusivamente nos anelídeos (Figura 4) (KENT et al., 2001; LOM; DIKOVÁ, 2002; LOM; DIKOVÁ, 2006).

Figura 4 - Desenho esquemático do ciclo de vida indireto dos mixosporídios: a) hospedeiro definitivo; b) actinosporo; c) hospedeiro intermediário; d) mixósporo.



Fonte: Adaptado de ATKINSON, 2006.

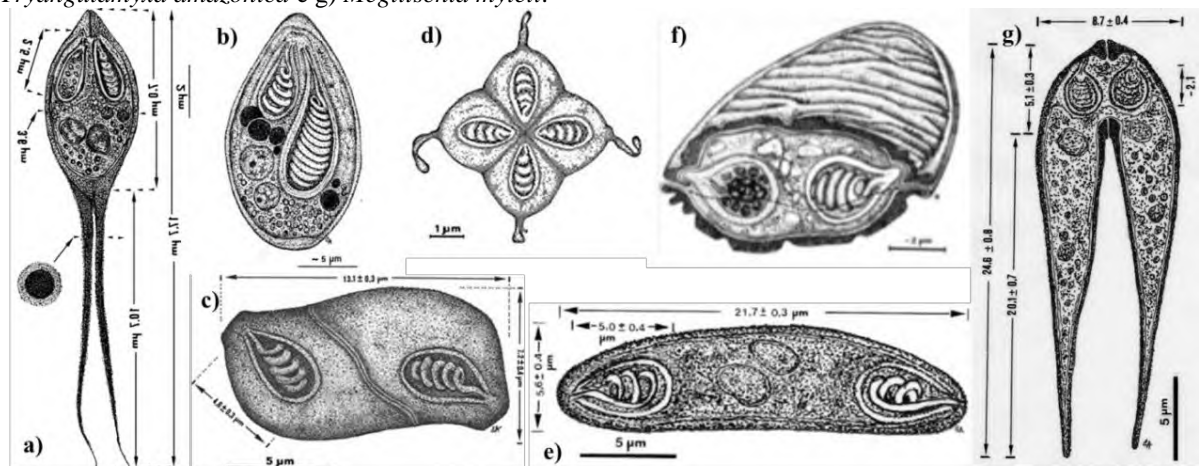
Os anelídeos eliminam os actinosporos na água, entram em contato com os peixes provocam a infecção do microparasito, podendo essa infecção não acontecer obrigatoriamente via oral, pois os actinosporos têm a capacidade de serem ancorados pela expulsão de seus filamentos polares nas brânquias e na pele dos peixes, possibilitando ao esporoplasma amebóide entrar no organismo dos peixes via parenteral; após passam por vários estados intra ou intercelulares dentro do peixe, migram para os locais onde ocorre o desenvolvimento do estado esporogônico dando origem aos mixosporos, que serão eliminados pelos peixes, e ao serem ingeridos pelos anelídeos, o esporoplasma inicia a fase de merogonia, ocorrendo uma

meiose e a formação de oito zigotos, que sofrerão divisão celular e diferenciação, formando oito actinosporos tri-radiados, os quais serão liberados na água, reiniciando o ciclo (BÉKÉSI et al., 2002; LOM; DIKOVÁ, 2006).

Segundo Barassa et al. (2003) muitas espécies de peixe que apresentam importância como recurso pesqueiro ou na piscicultura, são infectadas por mixozoários, podendo causar grandes prejuízos econômicos, com altas razões de mortalidade. No Brasil, estão descritas mais de 79 espécies de mixosporídios em peixes de água doce, pertencentes a sete gêneros distintos, entre os quais estão *Myxobolus*, *Kudoa*, *Ellipsomyxa*, entre outros (GRIFFIN et al., 2008; EIRAS et al., 2010).

Na Amazônia, especialmente no Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo - LPCA, entre os principais grupos de mixosporídios estudados, estão os gêneros *Myxobolus* Bütschli 1882, *Henneguya* Thélohan 1892, *Triangulamyxa* Azevedo et al. 2005; *Kudoa* Meglitsch 1947, *Meglitschia* Kovaleva 1988, *Ellipsomyxa* KØIE 2003, e *Myxidium* Bütschli, 1882 (Figura 5).

Figura 5 - Desenhos esquemático dos diferentes gêneros de mixosporídios estudados no LPCA: a) *Henneguya rondoni*; b) *Myxobolus desaequalis*; c) *Ellipsomyxa gobiodes*; d) *Kudoa aequidens*; e) *Myxidium volitans*; f) *Tryangulamyxa amazonica* e g) *Meglitschia myleii*.



Fonte: a) AZEVEDO et al., 2008; b) AZEVEDO; CORAL; MATO, 2002; c) AZEVEDO et al., 2013; d) CASAL et al., 2008a; e) AZEVEDO et al., 2011c; f) AZEVEDO et al., 2005; g) AZEVEDO et al., 2011d.

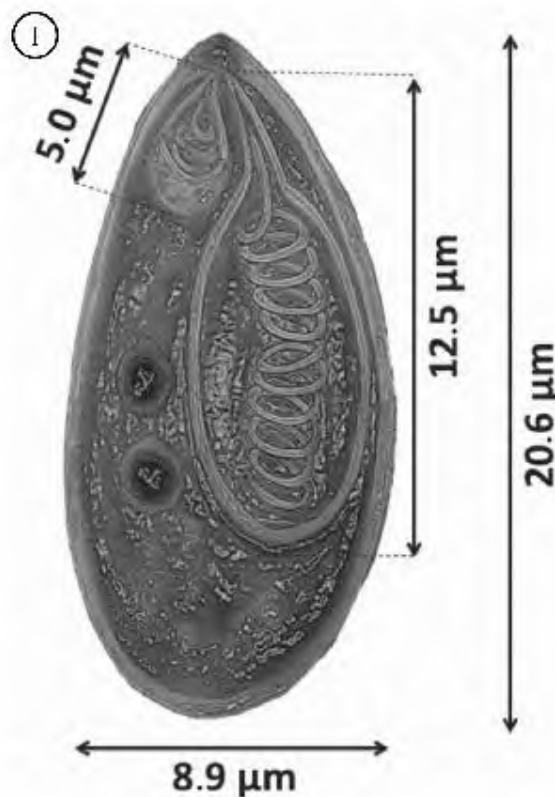
2.5.1.1 Gênero *Myxobolus* (Bütschli, 1882)

Na classe Myxosporrea, o *Myxobolus* é o gênero mais diversificado e com maior número de espécies, infectando principalmente peixes, porém, um pequeno número de espécies podem parasitar anfíbios e répteis, possuindo mais de 800 espécies descritas (EIRAS et al., 2005; LOM e DYKOVÁ, 2006; EIRAS et al., 2014). Das 100 espécies de mixozoários

conhecidas no Brasil, aproximadamente 58 espécies pertencem ao gênero *Myxobolus* (NALDONI et al., 2011).

Os representantes deste gênero são pertencentes à ordem Bivalvulida, apresentam corpo elipsóide, duas cápsulas polares e duas valvas posicionadas paralelamente a linha de sutura, possuindo esporoplasma com célula binucleada, de forma geralmente esférica e por vezes, contendo uma inclusão polissacarídica (Figura 6) (KENT et al., 2001; LOM; DIKOVÁ, 2002; LOM; DIKOVÁ, 2006).

Figura 6 – Desenho esquemático de esporo de *Myxobolus* sp. (vista frontal), apresentando as principais medidas morfométricas.



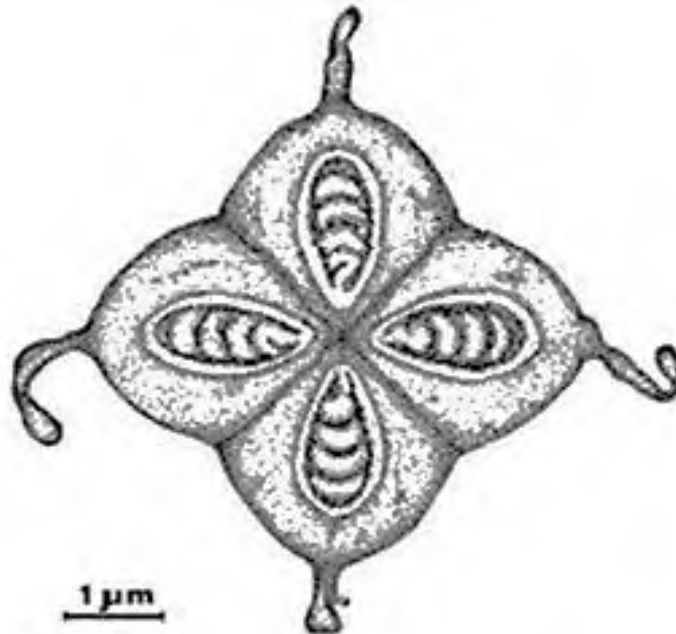
Fonte: Sindeaux-Neto et al., 2016.

Deste gênero, a espécie mais estudada é o *M. cerebralis*, microparasito causador da chama “doença do rodopio” ou “doença da cauda negra”, que se manifesta nos exemplares jovens, sendo responsável por uma alta taxa de mortalidade de salmonídeos no mundo todo, tanto em pisciculturas quanto em ambientes naturais, chegando a ser incluída na lista de doenças de peixes de declaração obrigatória nos países em que existe legislação sobre as mesmas (EIRAS, 1994; ALLEN; BERGERSEN, 2002).

2.5.1.2 Gênero *Kudoa* (Meglitsch, 1947)

O gênero *Kudoa* pertence a ordem Multivalvulida, possui aproximadamente 86 espécies, sendo todas parasitos de peixes, que se caracterizam por apresentar esporos quadrangulares, estrelados ou arredondados em observação apical, com quatro ou mais valvas e quatro cápsulas polares (Figura 7). Esses parasitos são encontrados geralmente na musculatura somática de seu hospedeiro, contudo, também já foram encontrados no coração, intestinos, brânquias, cérebro, rins e vesícula biliar, podendo causar sérios danos em peixes, seja em ambientes naturais ou em pisciculturas (LOM; DYKOVÁ, 1992; ANDRADA et al., 2005; LOM; DYKOVÁ, 2006; WOO, 2006; CASAL, 2009).

Figura 7 - Desenho esquemático de espora do gênero *Kudoa aequidens* (vista frontal).



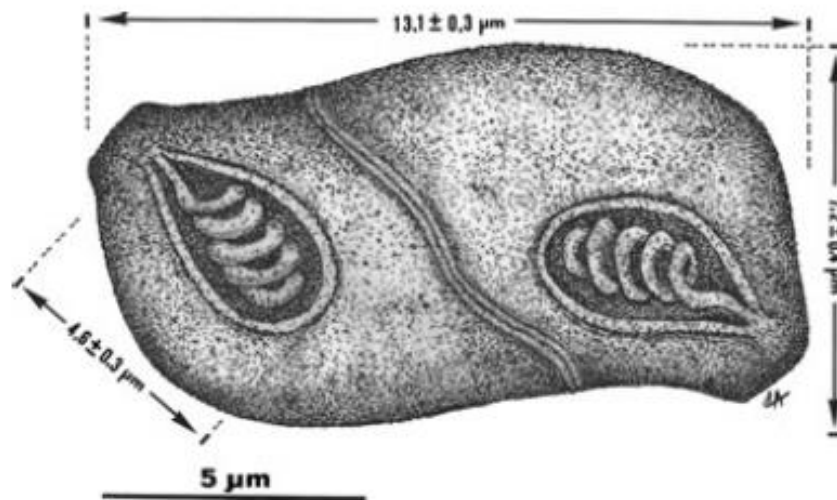
Fonte: Adaptado de Casal et al., 2008.

As parasitoses causadas pelas espécies desse gênero têm sido estudadas principalmente em peixes que possuem elevado valor econômico, pois quando infectam a musculatura, formam pseudocistos dentro das fibras musculares, com aparência de cordões brancos ou negros ao longo da musculatura e após a morte do hospedeiro ocasionam a mioliquefação da carne tornando-a inviável para o consumo, acarretando na diminuição da aceitação comercial do pescado (LOM; DYKOVÁ, 1992; VAZ, 2000; WOO, 2006). Vale destacar que já foi confirmado, para o humano, surto de intoxicação no Japão, ocasionada por contaminação após consumo de peixe cru infectado por *Kudoa* (KAWAI et al., 2012).

2.5.1.3 Gênero *Ellipsomyxa* (Køie, 2003)

O gênero *Ellipsomyxa*, está dentro da ordem Bivalvulida, apresentando válvulas de paredes finas alongadas ou hemisféricas, duas cápsulas polares arredondadas presentes no eixo longitudinal em extremidades opostas, com filamentos polares internos; em uma vista lateral, as cápsulas ocorrem perto da superfície em lados opostos (Figura 8) (KØIE, 2003; AZEVEDO et al., 2013).

Figura 8 - Desenho esquemático do esporo da espécie *Ellipsomyxa gobioides* (vista frontal), apresentando as principais medidas morfométricas.



Fonte: Adaptado de Azevedo et al., 2013.

Esse gênero possui várias espécies, como *E. gobii* (KØIE, 2003), *E. syngnathi* (KØIE; KARLSBAKK, 2009), *E. mugilis* (SITJÀ-BOBADILLA; ALVAREZ-PELLITERO, 1993; KØIE; KARLSBAKK 2009), *E. adlardi* (WHIPPS; FONT, 2013), *E. gobioides* n. sp (AZEVEDO et al., 2013), *E. maniliensis*, *E. apogoni*, *E. nigropunctatis* e *E. arothroni* (HEINIGER; ADLARD, 2014), *E. kalthoumi* (THABET et al., 2016), *E. amazonensis* (ZATTI et al., 2018) e mais recentemente *E. arariensis* (SILVA et al., 2018), todos descritos infectando a vesícula biliar do seu hospedeiro.

De acordo com Køie (2003), a denominação desse gênero refere-se à forma de mixosporo, diferenciado dos demais membros da família Ceratomyxidae Doflein, 1899, possuindo como característica válvulas com parede finas alongadas ou hemisféricas, tendo uma vista apical ou polar, com cápsulas com tamanhos iguais, desiguais ou esféricas, além de ausência das cápsulas polares perto da linha de sutura.

2.5.2 Filo Microsporidia (Balbiani, 1882)

Os microsporídios foram classificados como pertencente ao Filo Microsporidia, sendo inseridos ao Reino Archeozoa, posteriormente ao Reino Protista. Com o avanço da tecnologia, a hipótese dos microsporídios serem inseridos no Reino Fungi ganhou força devido ao surgimento de vários dados de biologia molecular mostrando proximidade nas relações filogenéticas (SPRAGUE et al., 1992; BALDAUF et al., 2000; BRUNS, 2006; JAMES et al., 2006). Lee et al. (2008) por meio de análises filogenéticas demonstraram que os microsporídios são fungos verdadeiros.

Os microsporídios são parasitos eucariotos intracelulares obrigatórios que não possuem estádios ativos fora das células hospedeiras e produtores de esporos, podendo ser encontrados parasitando diversas regiões do corpo do hospedeiro, estando presentes em alguns grupos de invertebrados e em todas as cinco classes de vertebrados, incluindo seres humanos, sendo os peixes seus principais hospedeiros (LOM; DYKOVA, 1992; SPRAGUE; BECNEL, 1998; AZEVEDO; MATOS, 2002; KEELING; FAST, 2002).

Este filo apresenta aproximadamente 1.200 espécies distribuídas por cerca de 187 gêneros e quase metade são conhecidos por infectar organismos aquáticos; a sua presença no hospedeiro pode causar infecções crônicas, diminuindo a condição corporal, sendo descritos nos peixes mais de 156 espécies de microsporídios e cerca de 20 gêneros (MAGALHÃES et al., 2006; KEELING; FAST, 2002; LEWIS et al., 2006; MATOS, 2007; CASAL et al., 2009; STENTIFORD et al., 2013; VÁVRA; LUKEŠ, 2013).

Segundo Matos (2007) os microsporídios possuem um complexo ciclo de vida, e tem como uma de suas características principais a produção de esporos resistentes, que são responsáveis pela transmissão horizontal do parasito, podendo ser encontrado no hospedeiro na forma esporal livre ou em cistos na fase adulta, ou em estágios de desenvolvimento iniciais, em ambas as formas sendo liberados quando o hospedeiro vem a óbito.

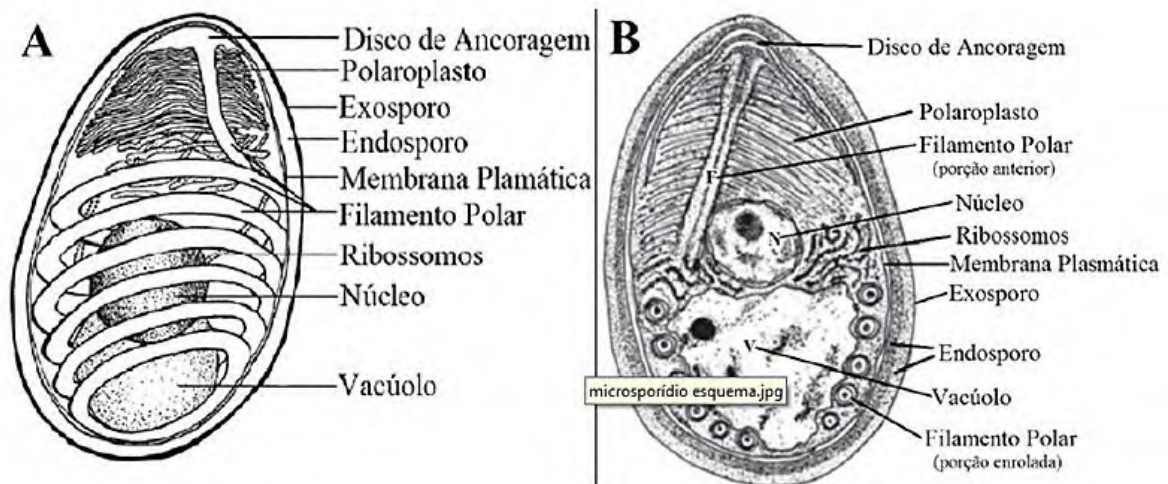
A característica mais diagnosticável de um microsporídio é o esporo (sua célula infecciosa), que é a única fase do ciclo de vida viável fora da célula hospedeira e mais facilmente reconhecível, possuindo forma variável, podendo ser mais ou menos alongada (bastonete até redonda), mas a maioria é ovóide (KEELING; FAST, 2002).

O esporo é unicelular, apresenta dimensões que variam entre 01 a 40 µm de comprimento apresentando como características morfológicas um esporoplasma uni ou binucleado contornado por uma parede de espessura variável composta por três camadas: o

exósporo (camada exterior proteica densa e de composição proteica); endósporo (camada interna luzente e de composição quitinosa) e uma membrana plasmática que envolve o citoplasma, o núcleo (podendo apresentar até dois núcleos), um vacúolo posterior, as membranas do polaroplasto e o aparelho de extrusão (Figura 9a) (FRANZEN; MÜLLER, 1999; BIGLIARDI; SACCHI, 2001; MATOS et al., 2004).

Uma característica marcante destes parasitos é o seu aparelho infeccioso, sendo composto por três organelas: o filamento polar (estrutura tubular enrolada em hélice ligada ao ápice do esporo por meio do disco ancoragem), o polaroplasto e o vacúolo posterior (Figura 9b) (VÁVRA; LARSSON, 1999). Keeling e Fast (2002) afirmaram que a diagnose da espécie de microsporídeo é permitida a partir do número de voltas do filamento polar, o seu arranjo espacial relativo e o ângulo de inclinação da hélice.

Figura 9 - Desenho esquemático de esporos de microsporídeo indicando suas estruturas morfológicas. A - Esquema tridimensional do esporo; B - esquema em corte transversal do esporo.



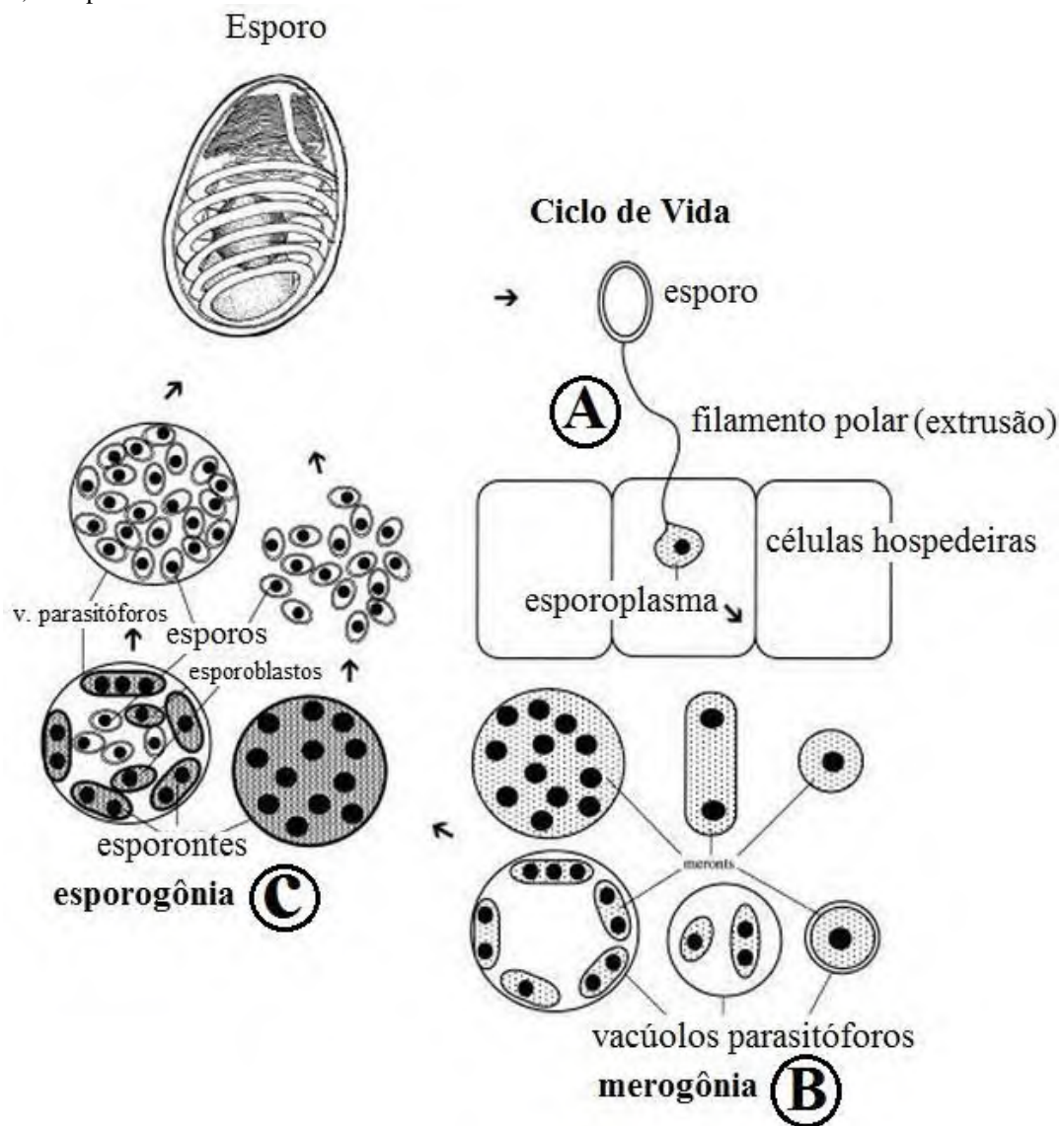
Fonte: A) FRANZEN; MÜLLER, 1999; B) MATOS et al., 2003.

De acordo com Figueiredo (1997), boa parte dos microsporídios parasitam todos os estados do desenvolvimento do hospedeiro, podendo ocasionar a sua morte em poucos dias ou meses, sendo sua especificidade variada. O modo como o microsporídeo invade novas células hospedeiras é considerado um dos mecanismos de infecção mais sofisticados em biologia, pois permite sua entrada na célula sem ser reconhecido e o protege das reações de defesa do hospedeiro (WEIDNER, 1972; KEOHANE; WEISS, 1999; CALI et al., 2002).

Dentro do hospedeiro, em condições favoráveis, o microsporídeo descarrega o tubo polar através da fina extremidade anterior do esporo, penetrando na nova célula hospedeira para inserir os esporoplasmas (Figura 10a), assim inicia-se a fase proliferativa do ciclo de

vida, ocorrendo a merogonia (Figura 10b), etapa em que o parasito aumenta massivamente o seu número tornando-se merontes, que na esporogonia se desenvolvem em esporontes, se caracterizando pela aparência de um revestimento superficial denso, então dividem-se em esporoblastos que finalmente se desenvolverão para esporos maduros (Figura 10c), e assim, reiniciam o ciclo (CALI; TAKVORIAN, 1999; VÁVRA; LARSSON, 1999; BIGLIARDI; SACCHI, 2001; MAGALHÃES et al., 2006).

Figura 10 - Representação esquemática do ciclo de vida dos microsporídios: A - extrusão do filamento polar e fusão com a célula hospedeira; B - fase merogônia, onde ocorre a divisão dos merôntes até originar os esporontes; C - fase esporogônia, onde os esporontes se diferenciam para originar os esporoblastos, e por seguinte, os esporos.



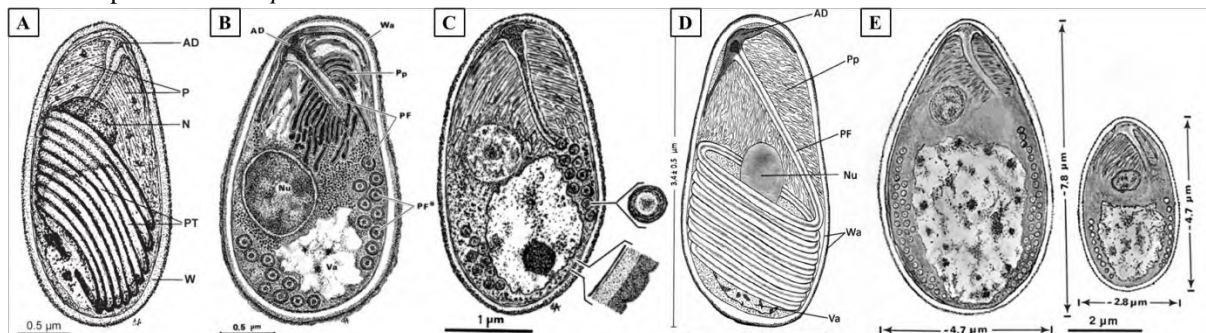
Fonte: FRANZEN E MÜLLER, 1999.

Como não procuram ativamente o seu hospedeiro, os esporos destes microparasitos precisam estar presentes no ambiente em que o hospedeiro vive, e os mesmos podem ser

transportados pelo vento, água, através de outros organismos, sendo inseridos nos hospedeiros de diversas maneiras, onde a forma mais comum é a ingestão via oral dos esporos (transmissão horizontal), e quando dentro do hospedeiro, pode ocorrer transmissão vertical, onde o microsporídio é transmitido aos descendentes, ocorrendo transovarialmente, onde a doença é transmitida aos ovos da fêmea infectada (FIGUEIREDO, 1997; BECNEL; ANDREADIS, 1999).

Na região Amazônica, especificamente no Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo (Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA/Belém), o grupo de pesquisa vem descrevendo espécies e gênero desse parasito em peixes, como: *Loma myrophis* (AZEVEDO; MATOS, 2002), *Amazonspora hassar* (AZEVEDO; MATOS, 2003a), *Microsporidium brevisrostris* (MATOS; AZEVEDO, 2004), *Potaspota morhaphis* (CASAL et al, 2008b), *Loma psittaca* (CASAL et al., 2009), *Kabatana rondoni* (CASAL et al, 2010), *Potaspota aequidens* (VIDEIRA et al, 2015) e *Pleistophora beebei* (CASAL et al, 2016) (Figura 11).

Figura 11 - Desenhos esquemático dos diferentes gêneros de microsporídios estudados no LPCA: a) *Microsporidium brevisrostris*, b) *Potaspota morhaphis*, c) *Kabatana rondoni*, d) *Potaspota aequidens*, e) Macro e micro esporo de *Pleistophora beebei*.



Fonte: A) MATOS; AZEVEDO, 2004; B) CASAL et al., 2008b; C) CASAL et al., 2010; D) VIDEIRA et al., 2015; E) CASAL et al., 2016.

2.6 Uso da Biologia Molecular na Ictioparasitologia

As análises morfológicas podem não serem suficientes para a caracterização precisa de uma espécie, portanto, o uso de métodos complementares como as técnicas de biologia molecular a partir do DNA ribossômico (rDNA), por exemplo, estão sendo uma ferramenta de grande importância para estudo de identificação de espécies (MENEZES et al., 2009).

Segundo Matos et al. (2004) os peixes são hospedeiros de uma grande variedade de grupos de microrganismos parasitos, que recentemente com o desenvolvimento da biologia molecular, muitas espécies foram reclassificadas, pois foi possível constatar que, em muitos

casos, a morfologia ultraestrutural dos parasitos não estavam relacionadas com os dados moleculares dos mesmos.

Para identificação de novas espécies e nos estudos filogenéticos de parasitos de peixes têm sido utilizados marcadores moleculares como o gene 18S que é altamente conservado e adequados para verificar a variação interespecífica; o rDNA que possui sequências intercalares que variam dentro e entre populações, e sequências codificadoras que são altamente conservadas, estando presente em um número elevado de cópias em todo o genoma do organismo; e os espaçadores intergênicos não-codificantes (ITS1 e ITS2) que são mais variáveis (MARCIEL, 2016).

As análises moleculares em estudos de parasitos de peixes vem sendo bastante utilizadas devido a eficácia nas determinações de espécies, contribuindo também na compreensão da biologia evolutiva e celular (CLARK, 2006). A identificação da maioria das espécies de mixozoários foi descrita através dos métodos tradicionais, baseados nas características morfológicas e morfométricas dos esporos, especificidade do hospedeiro e tropismo no tecido, porém, nos últimos anos pesquisadores estão utilizando a biologia molecular para identificar e diferenciar espécies de mixosporídios que apresentam características morfologicamente semelhantes (FERGUSON et al., 2008; ZHAO et al., 2008; IWANOWICZ et al., 2008).

Na América do Sul, vários autores desenvolvem estudos taxonômicos sobre mixosporídios parasitos de peixes de água doce, no entanto, poucos são os trabalhos taxonômicos feitos utilizando análise molecular (ADRIANO et al., 2009a; MILANIN et al., 2010; NALDONI et al., 2011; AZEVEDO et al., 2016). Bahri et al. (2003) e Zhao et al. (2008) sugerem que, pelo fato dos esporos dos mixosporídios serem pequenos e apresentarem tantas similaridades entre si, o uso da biologia molecular é de grande relevância para o estudo taxonômicos desse grupo, pois a classificação baseada apenas na morfologia são inconsistentes podendo induzir a erros.

Vale ressaltar que, assim como, na identificação de espécies de mixozoários, as técnicas de biologia molecular também estão sendo empregadas no estudo de hipóteses filogenéticas e na elucidação do ciclo de vida do grupo (FIALA, 2006; FERGUSON et al., 2008; ATKINSON; BARTHOLOMEW, 2009; MILANIN et al., 2010; NALDONI et al., 2011).

Com relação aos microsporídios de peixe, os mesmos agrupam-se em cinco grupos e apenas alguns gêneros são monofiléticos, existindo várias sequências de RNA ribossômico

SSU (rRNA) disponíveis em GenBank, correspondendo a 44 espécies de microsporídios em peixes (LOM; NILSEN, 2003). De acordo com Vossbrinck e Debrunner-Vossbrinck (2005), estudos filogenéticos baseados na análise molecular dos genes rRNA têm sido uma poderosa ferramenta na identificação de novos gêneros e espécies, bem como no agrupamento de táxons familiares. No Brasil, poucos são os trabalhos taxonômicos feitos utilizando análise molecular para microsporídio parasitando peixes (CASAL et al., 2008b; CASAL et al., 2009; CASAL et al., 2010; CASAL et al., 2012; VIDEIRA et al., 2015; CASAL et al., 2016).

2.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Varredura

A microscopia eletrônica tem sido uma ferramenta que compreende um conjunto de técnicas que possibilitam a caracterização morfológica de um material, composição química, além de determinar a estrutura atômica, tanto de metais, cerâmicas e polímeros, como de espécimes biológicas (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). Com o passar do tempo, o desenvolvimento da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, ambos utilizando feixes de elétrons no lugar de fótons, possibilitou uma maior resolução de detalhes que antes eram imperceptíveis em microscopia de luz (ML) (RAMOS, 2013).

O microscópio eletrônico de transmissão (MET) é utilizado para analisar materiais biológicos, permitindo definições de imagens intracelulares, observação da morfologia celular, aspectos gerais das organelas, a interação de parasitos-células, bem como informações sobre alterações celulares ocasionados por microrganismos (GALLETI, 2003).

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), a sua principal aplicação é no estudo de detalhes estruturais finos, de materiais pequenos, tridimensionais, revelando uma riqueza de detalhes estruturais, permitindo, dessa forma, que taxonomistas identifiquem espécies e que encontrem informações importantes para a classificação (GRIMSTONE, 1980).

Apesar da utilização da biologia molecular na identificação dos mixosporídios, as técnicas de ultraestrutura como microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, também auxiliam nos estudos de identificação dos grupos de parasito, pois tais técnicas permitem uma identificação interface parasito-hospedeiro e de esporogênese (CURRENT, 1979; ROCHA et al., 1992; ALI et al., 2007; AZEVEDO et al., 2011a).

A técnica de MET se mostra de grande importância no estudo dos mixozoários, pois fornece informações relevantes a respeito da morfologia dos esporos, bem como o número de voltas do filamento polar desses parasitos (VIEIRA, 2016). No Brasil, vários trabalhos

utilizaram a MET como ferramenta para descrever novas espécies de mixozoários parasitos, dentre os quais estão: Azevedo e Matos (1996), Azevedo e Matos (2003), Casal et al. (2003), Matos et al. (2005), Tajdari et al. (2005), Adriano et al. (2006), Casal et al. (2006), Azevedo et al. (2008), Adriano et al. (2009b), Azevedo et al. (2010), Azevedo et al. (2011b).

Em contraste, com a utilização de MEV é possível observar diretamente as superfícies das estruturas poliméricas tais como, membranas, fibras, entre outras, sendo a principal vantagem dessa técnica o método simples de preparação na maioria dos casos, porém a sua resolução é inferior a do MET (HOLINK et al., 1979; DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). De acordo com Goldstein et al. (1992), a preparação apropriada da amostra garante a reprodução e a confiabilidade da posterior observação.

Segundo Matos et al. (1999) o estudo de microparasitos observados em ML, MET e MEV, tem sido objeto de diversos trabalhos, permitindo estabelecer diferenças e semelhanças ultraestruturais que facilitam a identificação de espécies e estabelecer relações filogenéticas entre espécies de grupos afins. Moreira (2013) afirma que o uso conjunto das técnicas morfológicas e as análises moleculares são complementares, e juntas, aumentam a qualidade dos resultados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar o estudo das características morfológicas e moleculares dos microparasitos eucarióticos presentes em *Trachelyopterus galeatus* e *Trachycorystes porosus*, oriundos dos municípios de Cachoeira do Ararí (Marajó) e Peixe-boi - PA.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar os microparasitos por meio das características morfológicas;
- Verificar a ocorrência de multiparasitismo nas espécies;
- Avaliar as possíveis alterações histopatológicas nos tecidos parasitados;
- Realizar a caracterização molecular dos microparasitos;
- Verificar a prevalência dos microparasitos identificados;
- Analisar a influência dos parâmetros ambientais com a ocorrência dos parasitos.

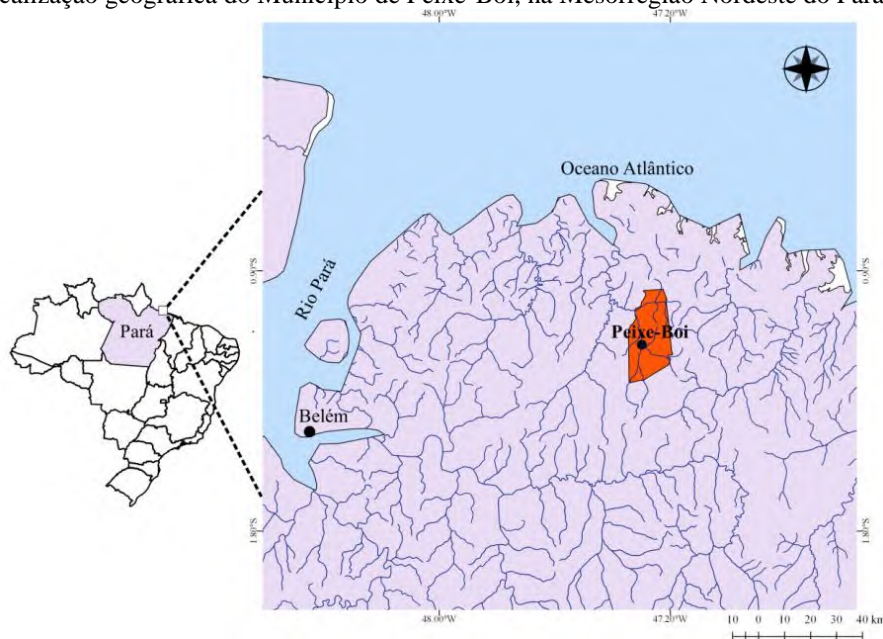
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

As coletas dos espécimes de *T. galeatus* foram realizadas em dois municípios distintos, Peixe Boi, que se encontra na microrregião bragantina e Cachoeira do Arari, localizado no arquipélago do Marajó-PA. A captura dos espécimes de *T. porosus*, foi realizada apenas no município de Cachoeira do Arari.

O município de Peixe Boi (01°07'S 47°18'W) apresenta uma bacia hidrográfica com aproximadamente 1.044,32 km² de área, é representada pela bacia do Rio Peixe Boi, demonstrando grande relevância no contexto hídrico do estado do Pará, localizando-se na mesorregião nordeste do Pará (Figura 12), na microrregião denominada bragantina, abrangendo além do município de Peixe-Boi os municípios de Capanema, Santarém-Novo, Nova Timboteua, Bonito e Primavera (SILVA; LIMA, 2000; RODRIGUES et al., 2005).

Figura 12 - Localização geográfica do Município de Peixe-Boi, na Mesorregião Nordeste do Pará.

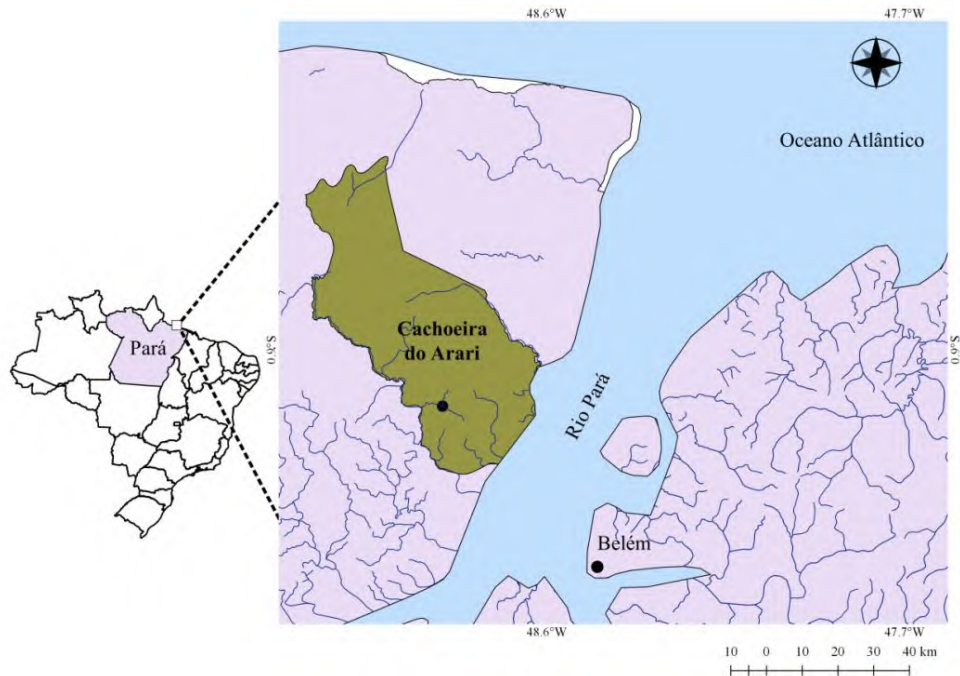


Fonte: Santos, 2019.

O município de Cachoeira do Arari (1°00''S 48°57''W), pertence a mesorregião do Marajó e à microrregião do Arari (Figura 13), apresenta a bacia hidrográfica do rio Arari, com 118 km de extensão e uma área de 864 km², sendo caracterizada por inúmeros paleocanais, principalmente em sua porção noroeste e pela presença dos lagos, possuindo importância econômica como via de penetração, de escoamento de bens e produtos, além de uma rica

ictiologia, constituindo dessa forma, a principal bacia hidrográfica da região de campos da ilha de Marajó (BARBOSA, 2005; SOUZA; ROSSETTI, 2009).

Figura 13 - Localização geográfica do Município de Cachoeira do Arari - Marajó.



Fonte: Santos, 2019.

4.2 Captura dos Espécimes

As coletas foram realizadas bimestralmente, em ambos os municípios (Peixe Boi e Cachoeira do Arari), capturando 10 indivíduos por coleta com auxílio de apetrechos de pesca como tarrafa e rede de emalhar (Figura 14).

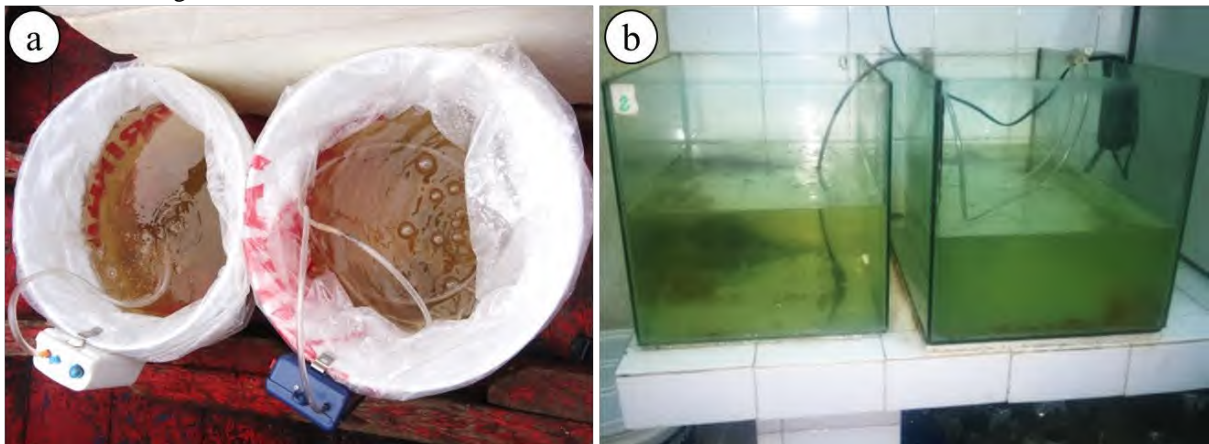
Figura 14 - Local de coleta dos exemplares no Município de a) Peixe-Boi e b) Cachoeira do Arari - Marajó.



Fonte: LPCA, 2019.

Após a captura, os peixes foram colocados em sacos plásticos dentro de baldes com água do ambiente e aeração artificial a pilha (Figura 15a); em seguida, transportados vivos até o Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo (LPCA), localizado na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), campus Belém. No laboratório, os espécimes foram transferidos para aquários de vidro com capacidade de 20 a 40 litros (Figura 15b) com temperatura em torno de 27-28° C, sendo realizada a devida aclimação e mantida a aeração artificial até que se proceda às análises.

Figura 15 - a) Exemplos em baldes com água do habitat após captura; b) Aquários onde os espécimes são mantidos ao chegarem no LPCA.



Fonte: LPCA, 2019.

A prevalência parasitária (em %) foi determinada de acordo com o descrito por Bush et al. (1997), utilizando a fórmula: $P = \frac{NTPP}{NTPE} \times 100$, onde:

P = prevalência;

NTPP = número total de peixes parasitados;

NTPE = número total de peixes examinados.

4.3 Eutanásia para colheita dos órgãos parasitados dos exemplares

Os espécimes foram anestesiados com Triclaína Metano sulfonato (MS222 SIGMA) na concentração de 50mg/L ou através de mielotomia neural, de acordo com CEUA - 013/2014 (Anexo 01). Em seguida, realizou-se a medição do comprimento total dos peixes (CT), fazendo uso de paquímetro (cm), e o peso (P), utilizando balança analítica de precisão (g). Em

estereomicroscópio (lupa) Zeiss Stemi DCR, a parte externa do corpo foi examinada para verificar a presença de cistos ou lesões.

Posteriormente, com auxílio de pinça e tesouras foi iniciada a necropsia dos animais, realizando um corte longitudinal e dois transversais na região ventral, seguindo da abertura urogenital até a região do opérculo, para análise dos órgãos internos (brânquias, vesícula biliar, fígado, entre outros) em busca por cistos e/ou tumefações, e das gônadas (testículo e ovário) para identificar o sexo (Figura 16). Todos os dados foram registrados em ficha de coleta (Anexo 02).

Figura 16 - Análise de exemplar por meio de estereomicroscópio, com finalidade de verificar indícios de parasitismo na sua cavidade celomática e órgãos internos.



Fonte: LPCA, 2019.

Observando a presença de cistos, pequenos fragmentos de tecido ou órgão foram retirados, comprimidos entre lâmina e lamínula com uma gota d'água, e analisados em microscópio de luz (Olympus CX41). Confirmado a presença do parasito, os órgãos e tecidos foram removidos e fixados para o processamento em técnica de microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, e para biologia molecular.

4.4 Microscopia de Luz

Para microscopia de luz (ML), os órgãos e tecidos removidos foram fixados em solução de Davidson (álcool 95%, formaldeído, ácido acético e água destilada), na proporção de nove partes de fixador para uma de material biológico (9:1), por um período de 24 horas.

Após fixação, os fragmentos foram processados de acordo com as técnicas padronizadas pelo LPCA (Anexo 03); passando por uma bateria de desidratação, concentrações de álcool crescente (70%, 80%, 90%, 100% I, 100% II e 100 III), álcool/xilol (50/50), diafanizados em xilol (I e II) e impregnação parafina líquida a 60° C.

Seguindo, realizou-se inclusão em parafina com o auxílio do aparelho Tissue Embedding Center Micron EC350, microtomia com corte a 05µm de espessura, utilizando micrótomo Rotary Microtome Micron HM315. Os referidos cortes (tecido + cisto) são pescados em banho-maria em lâminas de vidro, colocados em estufa a 60°C para fixação dos mesmos na lâmina.

Após essa etapa, as lâminas + cortes foram retiradas da estufa, e realizou-se a coloração em Hematoxilina e Eosina (HE) e em técnica especial Ziehl-Neelsen (ZN) (LUNA, 1968). Imagens das lâminas coradas com tecido + cisto, foram capturadas com auxílio de microscópio de luz ZEISS Primo Star com câmera fotográfica ZEISS AxioCamERc 5s acoplada, com software AxioVision 5.1 e microscópio de contraste de interferência diferencial (DIC) ZEISS AxioScope.A1 com câmera fotográfica ZEISS AxioCam 512 color, para documentação fotográfica.

4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Varredura

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada de acordo com as técnicas padronizadas no LPCA/UFRA e no Laboratório de Pesquisa Edilson Matos (LAPEM/UFPA) (Anexo 04), onde os pequenos fragmentos dos tecidos parasitados foram fixados em glutaraldeído 5% tamponado em cacodilato de sódio (pH 7.2) a 0,2 M, durante 03 horas a 4°C. Após, lavados na mesma solução tampão por 02-04 h a 4°C, e em seguida realizou-se uma pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2% tamponado, por 02 a 03 horas sendo mantida a temperatura de 4°C.

Posteriormente, os fragmentos foram desidratados em série crescentes de etanol (50%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 100% I, II e II) e óxido de propileno (I, II e II), passando por uma impregnação em óxido de propileno + Epon™ (3:1, 1:1 e 1:3), e incluídos em Epon Total, sendo levados à estufa 60°C por 03 dias para polimerização.

Seguindo, com auxílio de ultramicrotomo, preparou-se os blocos de Epon com formato de pirâmide, e se obtêm corte semi-fino com 01 µm de espessura, os quais foram corados com azul de toluidina a 5% aquoso ou Azur II, para verificar a presença de cisto ou

esporo na amostra. Com a amostra positiva, realizou-se cortes ultrafinos nos blocos, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, para observação em microscópio eletrônico de transmissão, operando a 80 kV. Ressaltando, que as etapas de ultramicrotomia serão realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA), assim como na Universidade do Porto/Portugal, utilizando Convênio e Acordo Internacional entre a Universidade do Porto e as Universidades Federal do Pará e Universidade Federal Rural da Amazônia.

Na análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as etapas se assemelham com a técnica de MET, onde a fixação dos fragmentos de órgãos ou cistos de microparasitos foi feita com glutaraldeído 5% tamponado com cacodilato de sódio (pH 7,2) a 0,2 M, por 3 horas a 4°C, seguindo de lavagem no mesmo tampão por 2-4 h a 4°C, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% tamponado, por 2 horas na mesma temperatura, sendo desidratados é realizada apenas em série crescente de etanol (50%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 100% I, II e II). Em seguida, realizou-se a secagem ao ponto crítico e metalização, para posterior observação no MEV- Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura no Instituto da Saúde e Produção Animal – UFRA/Belém. Tais etapas são realizadas de acordo com as técnicas padronizadas no LPCA/UFRA e LPEM/UFPA.

4.6 Biologia Molecular

Para a biologia molecular (BM), os materiais coletados (cistos e/ou tecidos infectados com esporos dos microparasitos) foram conservados em álcool etílico 80% e mantidos a -04°C. A extração do DNA total de cada amostra foi realizada com uso do Pure Link Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante.

Após a extração, realizou-se as amplificações dos DNA por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), usando os primers específicos (Kudf e Kudr, de acordo com WHIPPS et al., 2003b), com auxílio do termociclador Applied Biosystems SimpliAmp™, nas condições da amplificação de 95°C durante 01 min para desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos de 95°C durante 15 seg (desnaturação), 55°C durante 15 seg (anelamento) e 72°C por 30 seg (extensão), terminando com 72°C durante 7 min (elongação) e 4,0°C a ∞.

Os produtos da PCR foram corados com SYBR® Safe (Invitrogen, EUA), passando por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE e analisados no aparelho de fotodocumentação L-Pix STi. Confirmada a amplificação, as amostras foram purificadas

usando o GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), de acordo com especificações do fabricante. Todos esses procedimentos são realizados no Laboratório de Genética Aplicada (LGA/UFRA).

Após purificação, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento, que é feito no analisador automático de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems™) utilizando o BigDye® v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit, conforme com as especificações do fabricante, e para confirmação das mutações observadas, cada amostra é sequenciada com ambos os iniciadores, direto e reverso. As sequências nucleotídicas obtidas foram editadas e alinhadas no programa BioEdit (HALL, 2007). As etapas dos sequenciamentos foram realizadas no ICB – UFPA ou por empresas prestadoras de serviços, seguindo ao alinhamento das sequências e confecção da árvore filogenética.

4.7 Análise dos Parâmetros da Água

Durante as coletas, foram realizadas medições *in situ* das variáveis abióticas da água, mensuradas com instrumentos, como temperatura (Mult TEMP – termômetro infravermelho), pH (pHmetro) e salinidade (salinômetro ATAGO), os quais foram utilizadas para verificar se há influência da sazonalidade do ambiente (período seco e chuvoso) na presença dos microparasitos nos hospedeiros.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas 12 coletas entre os anos de 2017 e 2018, onde foram capturados 160 exemplares de *T. galeatus* (80 em Cachoeira do Arari e 80 em Peixe-boi) e 80 de *T. porosus* em Cachoeira do Arari. Por meio de análises detalhadas, realizadas com auxílio do estereomicroscópio, microscópio de luz e DIC, foi possível observar a presença de microparasitos pertencentes aos filos Myxozoa e Microsporídia nos exemplares.

Em média, os espécimes analisados apresentaram comprimento e peso aproximados (Tabela 1), porém, não foi observada nenhuma relação destas medidas com a intensidade de infecção dos parasitos.

Tabela 1 – Pesos e comprimentos dos espécimes e seus respectivos municípios de captura.

Espécie	Comprimento Total (cm)	Peso Total (g)	Município
<i>T. galeatus</i>	13,00 (10,5-16,5)	50,54 (27,97-80,3)	Cachoeira do Arari
<i>T. galeatus</i>	12,3 (9,12-14,0)	42,09 (23,6-67,43)	Peixe-boi
<i>T. porosus</i>	12,7 (9,85-15,3)	46,71 (25,38-72,87)	Cachoeira do Arari

No decorrer das análises, foi verificada a presença de parasitismo em diferentes órgãos dos espécimes (filamentos branquiais, musculatura estriada esquelética, vesícula biliar), onde todos os exemplares, tanto os oriundos de Cachoeira do Arari quanto os de Peixe-boi, apresentaram multiparasitismo ou pelo menos um dos órgãos parasitados (Tabela 2).

Tabela 2 – Espécimes analisados e respectivos microparasitos encontrados e órgão infectados.

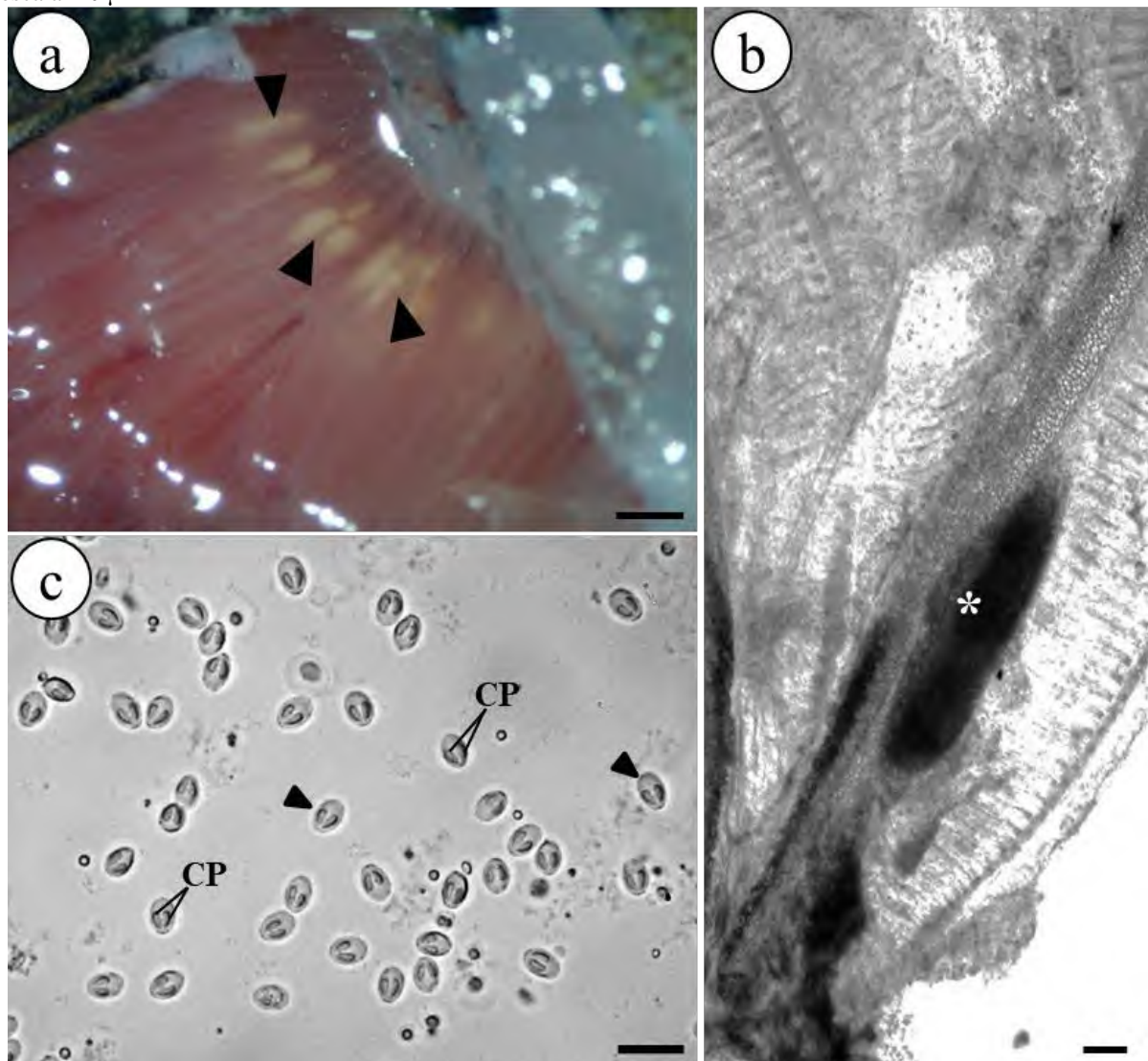
Hospedeiros	Parasito (Gênero)	Órgão Parasitado	Município
<i>T. galeatus</i>	<i>Kudoa</i>	Musculatura	Peixe-boi/ Cachoeira do Arari
	<i>Ellipsomyxa</i>	Vesícula biliar	
	<i>Myxobolus</i>	Brânquias	
	Microsporídio	Musculatura	
<i>T. porosus</i>	<i>Kudoa</i>	Musculatura	Cachoeira do Arari
	Microsporídio		

5.1 *Myxobolus* sp. parasitando as brânquias de *T. galeatus*

Em estereomicroscópio foi possível observar a presença de vários cistos pequenos de coloração esbranquiçada nos filamentos branquiais dos exemplares de *T. galeatus* de ambos

os municípios (Figura 17a), que ao serem retirados e colocados entre lâmina e lamínula com uma gota d'água, puderam ser melhor visualizados em microscopia de luz (Figura 17b). Após o rompimento observou-se inúmeros esporos arredondados com formato piriforme, contendo duas cápsulas polares de tamanhos iguais voltadas para o ápice, características morfológicas comuns ao gênero *Myxobolus* (Figura 17c).

Figura 17 – Fotomacrografia: a) Brânquias de *T. galeatus* apresentando cistos esbranquiçados. Barra de escala: 500 μ m; Fotomicrografia: b) Observação à fresco do cisto (*) presente no filamento branquial. Barra de escala: 100 μ m; c) Esporos maduros de *Myxobolus* sp. (cabeça de seta), evidenciando as cápsulas polares (CP). Barra de escala: 20 μ m.



A presença de *Myxobolus* parasitando as brânquias de peixes já foi relatada por diversos autores, inclusive no Brasil como, a ocorrência de *M. sciades* em *Sciades herzbergii* (AZEVEDO et al., 2010); *M. brycon* em *Brycon hilarii* (AZEVEDO et al., 2011a); *M. lomi* em *Prochilodus lineatus* (AZEVEDO et al., 2014); *Myxobolus* sp. em *Hoplias malabaricus*

(SANTOS, 2016); *M. tapajosi* em *Brachyplatystoma rousseauxii* (ZATTI et al., 2018); *M. bragantinus* em *Mugil rubrioculus* (CARDIM et al., 2018).

Assim como foi verificado a presença deste microparasito em diferentes órgãos como, *M. testicularis* em testículos de *Hemiodopsis microlepis* (TAJDARI et al., 2005); *M. metynnis* no tecidos subcutâneos de *Metynnis argenteus* (CASAL et al., 2006); *Myxobolus* sp. no palato de *Gobioides broussonnetii* (VELASCO et al., 2012); *Myxobolus* sp. no músculo cardíaco de *Pimelodus ornatus* (MATOS et al., 2014); *M. longissimus* na parede externa do estômago de *Colossoma macropomum* (CAPODIFOGGIO et al., 2019); *M. arariensis* na musculatura de *Rhamdia quelen* (ABRUNHOSA et al., 2018).

No presente estudo, foi observado que a prevalência deste microparasito variou com relação a área de coleta, pois 71% (57/80) dos espécimes capturados em Peixe-boi apresentaram cistos contendo esporos de *Myxobolus* sp., onde também se constatou um maior número de cistos nas brânquias, enquanto que 55% (44/80) dos exemplares de Cachoeira do Arari apresentaram parasitismo nas brânquias, verificando que os *T. galeatus* de Peixe-boi se encontravam mais parasitados do que os exemplares de Cachoeira do Arari.

De acordo com Roberts (2001), estudos mostram que as brânquias estão entre os órgãos mais acometidos pelas infecções por mixosporídios, e por serem órgãos que apresentam grande importância no metabolismo e homeostase dos peixes, a ação do parasito nesta região pode dificultar as trocas gasosas e iônicas, comprometendo a saúde do animal.

As análises morfométricas demonstraram que os esporos de *Myxobolus* sp. encontrados nos exemplares oriundos de Peixe-boi mediam 3,84 (3,68-4,01) µm de comprimento e 2,55 (2,40-2,76) µm de largura, e suas cápsulas polares 1,99 (1,91-2,15) µm de comprimento e 0,71 (0,59-0,77) µm de largura, por sua vez, os capturados em Cachoeira do Arari mediam 3,84 (3,68-4,01) µm de comprimento e 2,55 (2,40-2,76) µm de largura, e suas cápsulas polares 1,99 (1,91-2,15) µm de comprimento e 0,71 (0,59-0,77) µm de largura.

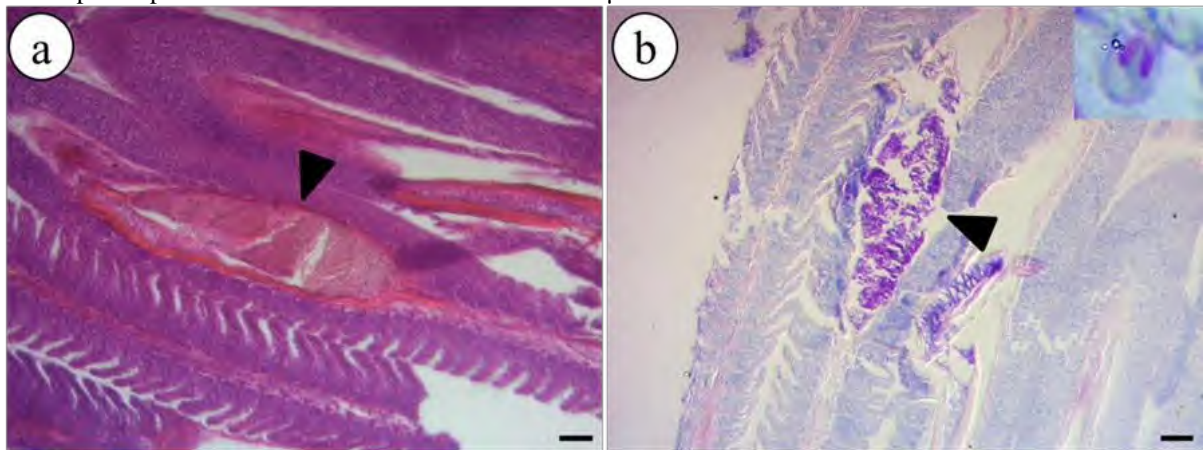
Pode se observar que os exemplares de ambos os municípios possuem medidas aproximadas, sendo bem menores quando comparados com outras espécies de *Myxobolus* já descritas parasitando peixes de regiões brasileiras. Os esporos com menores medidas observados foram *M. bragantinus* em *Mugil rubrioculus* (CARDIM et al., 2018) e *Myxobolus* sp. em *Pimelodus ornatus* (MATOS et al., 2014), sendo o hospedeiro deste último oriundo de Cachoeira do Arari. Entretanto, ainda sendo maiores que os *Myxobolus* sp. encontrados nos espécimes de *T. galeatus*, o que poderia indicar uma espécie nova (Tabela 3).

Tabela 3 - Medidas descritivas comparativas (médias, com intervalos entre parênteses: μm) de *Myxobolus* spp. do presente estudo junto a outras espécies que parasitam peixes de regiões brasileira.

Espécie	Hospedeiro	Órgão Infectado	Esporo			Cápsula Polar		Localidade	Referências
			Formato	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura		
<i>Myxobolus</i> sp.	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	Brânquias	Piriforme	3,84 (3,68-4,01)	2,55 (2,40-2,76)	1,99 (1,91-2,15)	0,71 (0,59-0,77)	Peixe-Boi	Presente estudo
<i>Myxobolus</i> sp.	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	Brânquias	Piriforme	3,81 (3,70-3,98)	2,57 (2,52-2,82)	2,02 (1,93-2,19)	0,74 (0,55-0,79)	Cachoeira do Arari	Presente estudo
<i>Myxobolus arariensis</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	Musculatura	Elipsoidal	11,4 (10,7-12,6)	7,2 (6,4-7,9)	4,0 (3,6-4,3)	1,9 (1,7-2,2)	Cachoeira do Arari	Abrunhosa et al., 2018
<i>Myxobolus</i> sp.	<i>Pimelodus ornatus</i>	Coração	Piriforme	8 \pm 0,2	5,8 \pm 0,4	3,6 \pm 0,3	1,2 \pm 0,2	Cachoeira do Arari	Matos et al., 2014
<i>Myxobolus bragantinus</i>	<i>Mugil rubrioculus</i>	Filamentos branquiais	Esférico	6,28 (5,98-6,9)	6,28 (5,98-6,9)	2,47 (2,11 - 2,88)	1,58 (1,28-1,79)	Bragança	Cardim et al., 2018
<i>Myxobolus marajoensis</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	Intestine	Piriforme	10,9	5,1	5,2	1,5	Salvaterra	Abrunhosa et al., 2017
<i>Myxobolus matosi</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	Parede interna do opérculo	-	9,6 \pm 0,4	7,0 \pm 0,3	4,3 \pm 0,4	1,9 \pm 0,1	Santarém	Capodifoglio et al., 2019
<i>Myxobolus longissimus</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	Parede externa do estômago	-	19,1 \pm 0,4	9,4 \pm 0,3	10,5 \pm 0,2	2,5 \pm 0,1	Santarém	Capodifoglio et al., 2019
<i>Myxobolus tapajosi</i>	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Filamentos branquiais	Oval	15 (13,5-17)	10,7 (9,6-11,4)	5,8 (4,6-7,1)	3,0 (2,3-3,8)	Santarém	Zatti et al., 2018
<i>Myxobolus figueirae</i>	<i>Phractocephalus hemioiopterus</i>	Pele	Ovóide	9,5 (9,1-10)	6,4 (5,8-6,9)	4,1 (3,5-4,6)	2,1 (1,7-2,6)	Santarém	Naldoni et al., 2018
<i>Myxobolus niger</i>	<i>Corydoras melini</i>	Arco branquial	Pririforme	11,3 \pm 0,4	6,8 \pm 0,2	5,0 \pm 0,3	2,0 \pm 0,1	Santa Isabel do Rio Negro	Mathews et al., 2016

Nas análises por meio das técnicas histológicas de laminas coradas em HE e ZN, pode-se verificar que os cistos de *Myxobolus* sp. se localizam preferencialmente na região cartilaginosa próxima do filamento branquial do hospedeiro, ocasionando deformidades morfológicas, que por consequência, podem acarretar a redução da capacidade respiratória do hospedeiro, porém nenhum infiltrado inflamatório foi observado nos órgãos parasitados (Figura 18a). Pela histologia também foi possível evidenciar as cápsulas polares e observar sua organização no interior dos esporos (Figura 18b).

Figura 18 - Fotomicrografia: a) Cisto de *Myxobolus* sp. (cabeça da seta) entre os filamentos branquiais corado em HE; b) Cisto de *Myxobolus* sp. corado em ZN (cabeça da seta), com destaque de imagem do esporo com as duas cápsulas polares evidenciadas. Barras de escala: 50 μ m.



Os parasitos pertencentes ao gênero *Myxobolus*, podem infectar qualquer órgão do corpo dos peixes, ocasionando aos mesmos, lesões e atrofia devido o crescimento dos plasmódios (LUQUE, 2004). Quando há intensas infecções desse parasito em órgãos considerados importantes, como as brânquias, podem vir a ser letais, causando processos infecciosos, comprometendo o funcionamento do órgão, agravando o quadro da doença para lise celular e afetando de forma negativa o desenvolvimento dos hospedeiros (MATOS et al., 2001; NALDONI et al., 2009).

Vários autores vêm realizando estudos histológicos de parasitismo nas brânquias dos peixes ocasionado por mixozoários, os quais observam alterações como focos inflamatórios, alterações nas estruturas branquiais, hiperplasia do epitélio das lamelas, compressão dos capilares e tecidos adjacentes dos filamentos, hemorragias, deslocamento do epitélio respiratório e obstrução dos vasos sanguíneos (MARTINS et al., 1997; MARTINS et al., 1999; ADRIANO et al., 2005; ADRIANO 2009a).

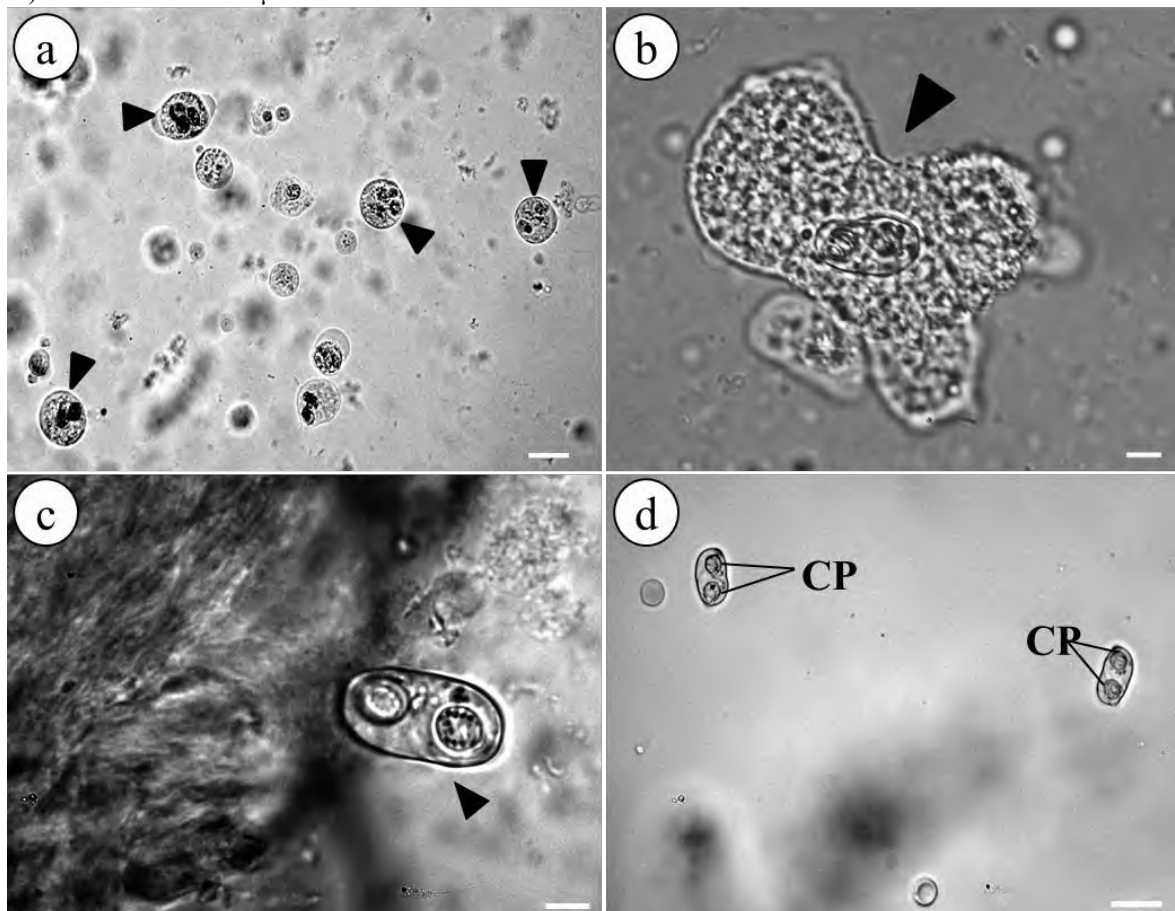
As lesões ocasionadas nas brânquias pela presença do parasito, acarretam efeito negativo no desempenho dos peixes comprometendo a integridade do animal, aumentando sua

susceptibilidade às doenças secundárias, podendo acarretar em uma alta taxa de mortalidade (HAWKIN et al., 1984; CAMPOS et al., 2011).

5.2 *Ellipsomyxa* sp. parasitando a vesícula biliar de *T. galeatus*

Foi observado por análises em microscopia de luz parasitismo na vesícula biliar dos exemplares de ambos os municípios, pela presença de plasmódios e esporos no líquido e na parede do órgão. Os plasmódios eram dispóricos e apresentavam formato arredondado (Figura 19a), os esporos eram ligeiramente alongados, elipsoides, com duas cápsulas polares esféricas de tamanhos iguais em lados opostos, apresentando filamento polar com 4 a 6 voltas (Figura 19c e 19d), possuindo linha de sutura formando um ângulo com o eixo de espessura, tais características identificadas como pertencentes ao gênero *Ellipsomyxa*.

Figura 19 - Fotomicrografia: a) Observação a fresco de plasmódios dispóricos arredondados (cabeça da seta) dispersos no líquido da vesícula biliar dos exemplares. Barra de escala: 50 μ m; b) DIC de Plasmódio rompido com esporo no seu interior. Barra de escala: 05 μ m; c) Esporo maduro de *Ellipsomyxa* sp. próximo a parede da vesícula biliar (cabeça da seta), evidenciando o número de voltas do filamento polar. Barra de escala: 05 μ m; d) Esporos maduros de *Ellipsomyxa* sp. dispersos no líquido no líquido vesical, evidenciando as cápsulas polares (CP). Barra de escala: 20 μ m.



Outros estudos descreveram a presença deste mixozoário infectando peixes da região amazônica, como em *Gobioides broussonnetii*, descrito por Azevedo et al. (2013), *Chaetobranchopsis orbicularis* por Sindeaux-Neto (2013), *Hoplias malabaricus* por Santos (2016), *Curimata cyprinoides* por Pereira (2017), *Pimelodus ornatus* e *Pygocentrus nattereri* por Silva et al. (2018), onde foram encontrados plasmódios dispóricos de *Ellipsomyxa* parasitando a vesícula biliar dos hospedeiros analisados, semelhante ao evidenciado no presente estudo.

Para este microparasito foi encontrada prevalência de 23,8% (19/80) para os espécimes do município de Peixe-boi e 26,25% (21/80) para os de Cachoeira do Arari. Em estudo realizado por Thabet et al. (2016), também foi evidenciado baixa prevalência do microparasito encontrado, verificando 3,6% para *E. mugilis* e 14,4% para *E. kalthoumi*, porém o resultado encontrado no presente estudo, se aproximou ao evidenciado por Zatti et al. (2018), com prevalência de 23,5% para *E. amazonensis* em *Brachyplatystoma rousseauxii*.

Os esporos de *Ellipsomyxa* encontrados nos *T. galeatus* capturados em Peixe-boi apresentaram 18,16 (17,0-20,03) μm de comprimento e 12,14 (11,0-14,3) μm de largura, as cápsulas polares possuíam 7,11 (6,7-7,72) μm de comprimento e 5,90 (5,25-6,57) μm de largura, valores maiores do que os observados nos esporos dos espécimes de Cachoeira do Arari, os quais possuíam 12,69 (12,4-13,5) μm de comprimento e 7,4 (6,2-8,5) μm de largura, e cápsulas polares com 3,56 (3,1-4,4) μm de comprimento e 2,68 (2,4-3,0) μm de largura (Tabela 4).

Quando comparados com a morfometria de outras espécies descritas parasitando a vesícula biliar de peixes, foi observado que os esporos dos exemplares de Peixe-boi se mostraram maiores as demais espécies, apenas se aproximaram das medidas de *E. kalthoumi* (THABET et al., 2016), porém essa espécie apresentou o número de voltas do filamento polar superior ao observado no presente estudo.

Por sua vez, os esporos dos exemplares de Cachoeira do Arari apresentaram medidas semelhantes as de *E. arariensis*, espécie descrita por Silva et al. (2018) parasitando duas espécies de peixes (*Pygocentrus nattereri* e *Pimelodus ornatus*), ambas oriunda do Rio Arari, mesma área de captura dos exemplares de *T. galeatus* deste estudo. O que poderia ser sugerido que o *Ellipsomyxa* encontrado nos *T. galeatus* e o *E. arariensis* são a mesma espécie, porém sendo necessário dados de biologia molecular para confirmação.

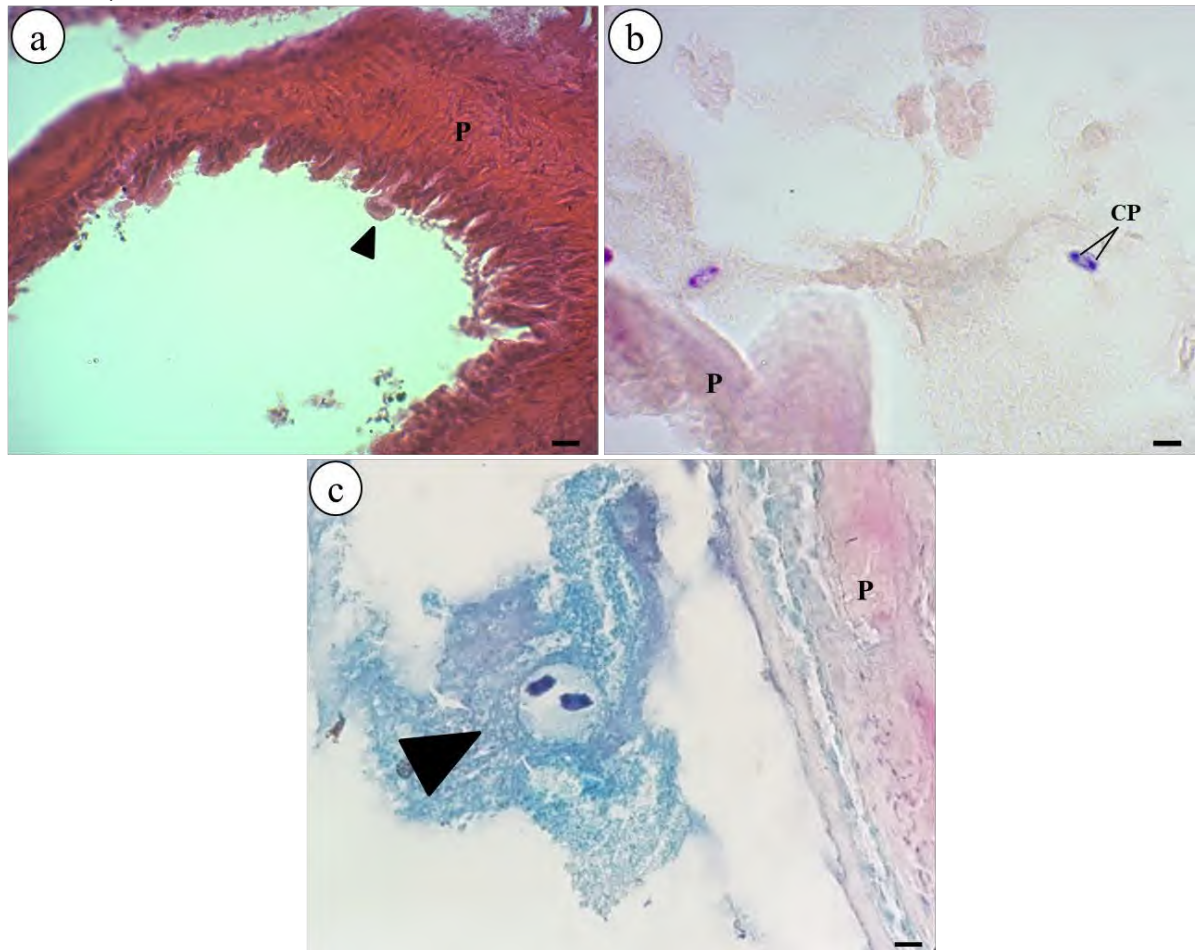
Tabela 4 - Medidas descritivas comparativas (médias, com intervalos entre parênteses: μm) dos *Ellipsomyxa* spp. encontrados em *T. galeatus* com as demais espécies descritas de *Ellipsomyxa* parasitando a vesícula biliar de peixes.

Espécie	Hospedeiro	Órgão Infectado	Formato do Esporo	CE	LE	CC	LC	Nº de voltas do filamento polar	Localidade	Referências
<i>Ellipsomyxa</i> sp.	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	Vesícula Biliar	Elipsóide	18,16 (17,0-20,03)	12,14 (11,0-14,3)	7,11 (6,7-7,72)	5,90 (5,25-6,57)	5 a 6	Peixe-boi	Presente estudo
<i>Ellipsomyxa</i> sp.	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	Vesícula Biliar		12,69 (12,4-13,5)	7,4 (6,2-8,5)	3,56 (3,1-4,4)	2,68 (3,4-3,0)	4 a 5	Cachoeira do Arari	Presente estudo
<i>Ellipsomyxa arariensis</i>	<i>Pigocentrus nattereri</i> <i>Pimelodus ornatus</i>	Vesícula Biliar	Elipsóide	12,6 (12,0-13,4)	7,3 (6,7-8,0)	3,5 (3,4-4,0)	2,6 (2,5-3,2)	5 a 6	Cachoeira do Arari	Silva et al., (2018)
<i>Ellipsomyxa gobioides</i>	<i>Gobioides broussonnetii</i>	Vesícula Biliar	Elipsóide	6,8 (6,5-7,0)	7,2 (6,9-7,5)	4,6 (4,3-4,8)	2,5 (2,1-2,7)	5 a 6	Salvaterra	Azevedo et al. (2013)
<i>Ellipsomyxa amazonensis</i>	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Vesícula Biliar	Elipsóide	12,80 (12,3-13,6)	7,6 (6,7-8,7)	3,8 (3,8-4,0)	3,1 (2,5-3,4)	2 a 3	Santarém	Zatti et al., (2018)
<i>Ellipsomyxa gobii</i>	<i>Pomatoschistus microps</i>	Vesícula Biliar	Elipsóide	7,0 (6,6-7,5)	8,7 (8,0-9,0)	3,1 (3,0-3,2)	-	6 a 7	Denmark	Køie (2003)
<i>Ellipsomyxa adlardi</i>	<i>Gobiosoma bosc</i>	Vesícula Biliar	Elipsóide	12,4 (11,3-14,4)	7,7 (7,1-8,8)	4,3 (3,9-4,9)	3,6 (3,3-4,1)	5 a 6	USA	Whipps; Font (2013)
<i>Ellipsomyxa manilensis</i>	<i>Arothron manilensis</i>	Vesícula Biliar	Ovoide	15,2 (13,8-17,1)	11,8 (10,2-13,3)	5,6 (4,6-6,6)	4,5 (4,2-5,0)	3 a 4	Australia	Heiniger; Adlard (2014)
<i>Ellipsomyxa arothroni</i>	<i>Arothron hispidus</i>	Vesícula Biliar	Ovoide	14,5 (11,3-16,0)	12,2 (9,4-13,8)	5,5 (4,5-6,7)	4,2 (3,1-5,0)	5 a 6	Australia	Heiniger; Adlard (2014)
<i>Ellipsomyxa kalthoumi</i>	<i>Liza saliens</i>	Vesícula Biliar	Elipsóide	17,2 (13-21)	13,2 (10-15)	5,5 (5-6)	-	9	Tunisia	Thabet et al. (2016)

CE – Comprimento dos Esporos; LE – Largura dos Esporos; CC – Comprimento das Capsulas Polares; LC - Largura das Capsulas Polares.

Através das técnicas histológicas, observou-se em HE a presença de plasmódio do microparasito aderido à parede da vesícula biliar, em ZN visualizou-se esporos e plasmódios dispóricos livres no líquido vesical com as cápsulas polares destacadas (Figura 20).

Figura 20 - Fotomicrografia: a) Plasmódio de *Ellipsomyxa* sp. (cabeça da seta) na parede (P) da vesícula biliar, corado em HE; b) Esporos de *Ellipsomyxa* sp. soltos na vesícula com as cápsulas polares marcadas (CP), corado em ZN; c) Plasmódio dispóricos (cabeça da seta) presente no líquido da vesícula biliar, corado em ZN. Barras de escala: 10 μ m

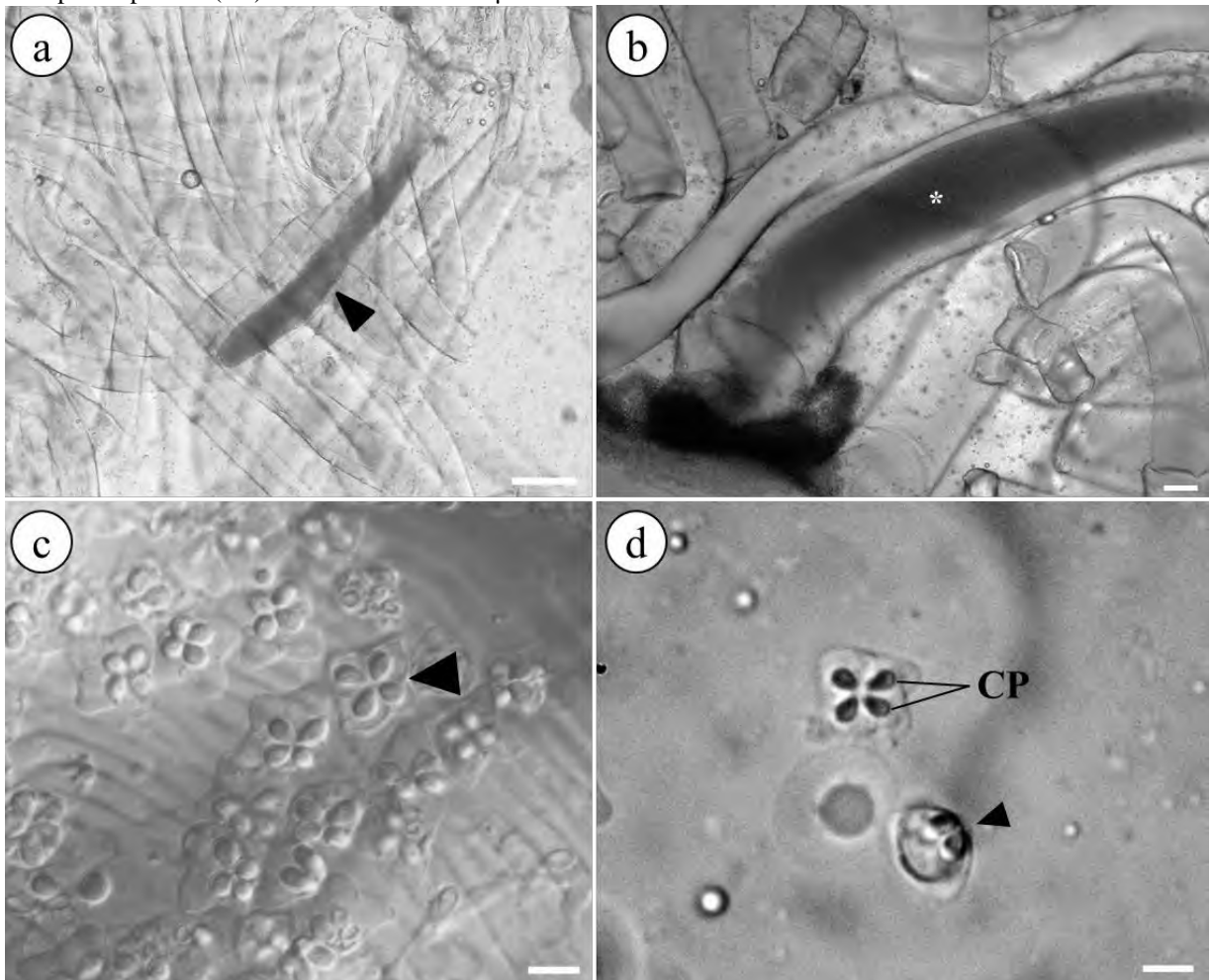


O gênero *Ellipsomyxa* possui apenas 14 espécies descritas, sendo em sua maioria parasitas de peixes de águas marinhas, salobras e estuarinas, até o presente momento somente duas espécies foram descritas parasitando peixes dulcícolas (ZATTI et al., 2018; SILVA et al., 2018). As espécies de *Ellipsomyxa* do presente estudo, também foram encontradas parasitando espécies de peixes exclusivas de água doce.

5.3 *Kudoa* sp. na musculatura de *T. galeatus* e *T. porosus*

Na musculatura estriada esquelética, através da observação em microscópio de luz, se verificou a presença de pseudocistos na região hipo e epaxial dos exemplares analisados (Figura 21a), e quando rompidos (Figura 21b), foram liberados esporos de mixosporídios apresentando formato pseudoquadrangular, com quatro cápsulas polares piriformes, localizadas lado a lado (Figura 21c e 21d), características comuns ao gênero *Kudoa*.

Figura 21 - Fotomicrografia: a) Pseudocisto nas fibras da musculatura esquelética (cabeça da seta) do hospedeiro. Barra de escala: 100 μ m; b) Pseudocisto rompido (*) liberando inúmeros esporos de *Kudoa* sp. na musculatura. Barra de escala: 50 μ m; c) DIC de *Kudoa* sp. livres na musculatura estriada do hospedeiro analisado (cabeça da seta); d) Esporos maduros de *Kudoa* sp. vista lateral (cabeça da seta) e apical evidenciando as cápsulas polares (CP). Barras de escala: 05 μ m.



Segundo Videira (2010), os parasitos do gênero *Kudoa* podem ser considerados típicos da musculatura esquelética, porém têm sido descritos ocorrendo em localizações diversificadas, como no músculo cardíaco, tegumento, barbatanas, cérebro, rim, peritônio,

glomérulos e mesentério. Além do mais, alguns dos membros desse gênero formam cistos macroscópicos nos músculos e causam problemas econômicos na venda dos peixes infectados (ABDEL-GHAFFAR et al., 2012).

Foi verificada a presença de pseudocistos de *Kudoa* sp. nas fibras musculares de aproximadamente 95% (76/80) dos espécimes de *T. galeatus* capturados no município de Peixe-boi, 85% (68/80) nos de Cachoeira do Arari e 90% (72/80) nos exemplares de *T. porosus*. Alta prevalência de *Kudoa* sp. na musculatura de peixes também foi descrita por Oliveira, et al. (2015) em *Plagioscion squamosissimus* oriunda do distrito de Outeiro/PA, e Sindeaux-Neto et al. (2017) em *Chaetobranchopsis orbicularis* proveniente do município de Cachoeira do Arari, Marajó/PA, ambos evidenciaram 100% de infecção nos hospedeiros.

Vários autores já descreveram espécies desse microparasito em peixes proveniente do município de Peixe-Boi/PA, como Casal et al. (2008), que verificaram a presença de *K. aequidens* no musculo sub-opercular de *Aequidens plagiozonatus*, porém com menor prevalência 35,7% (10/28) que o evidenciado no presente estudo; e de Cachoeira do Arari, como Azevedo et al. (2016), que descreveram *K. orbicularis* em *Chaetobranchopsis orbicularis*, também observado baixa prevalência de indivíduos infectados 47,6% (20/42).

Nos *T. galeatus* de Peixe-boi, os esporos apresentaram 5,14 (4,72-5,98) µm de comprimento e 7,80 (7,66-7,97) µm de largura, nos de Cachoeira do Arari apresentaram comprimento de 4,65 (4,04-5,54) µm e largura de 5,25 (4,78-5,98). Já os esporos vistos em *T. porosus* possuíam comprimento de 6,38 (6,20-6,87) µm e largura de 9,35 (9,10-9,78) µm, tendo as maiores medidas entre os mesmos. Os dados da morfometria dos esporos de *Kudoa* spp. encontrados nos espécimes analisados foram comparados com outras espécies de *Kudoa* (Tabela 5).

Observou-se que o *Kudoa* sp. de *T. galeatus* provenientes de Peixe-boi possuíam medidas próximas as de *Kudoa paralichthys* em *Paralichthys olivaceus* (CHO; KIM, 2003), por sua vez, os esporos dos exemplares de Cachoeira do Arari já tiveram medidas próximas as descritas por Azevedo et al. (2016) e Sindeaux-Neto et al. (2017) para *K. orbicularis* parasitando *C. orbicularis*. Para o *Kudoa* sp. observado em *T. porosus*, as medidas ficaram próximas as de *Kudoa islandica* que foi verificado parasitando a musculatura de *Anarhichas minor* (KRISTMUNDSSON; FREEMAN, 2014.)

Tabela 5 - Medidas descritivas comparativas (médias, com intervalos entre parênteses: μm) dos *Kudoa* spp. encontrados em *T. galeatus* e *T. porosus* com outras espécies descritas de *Kudoa* parasitando peixes.

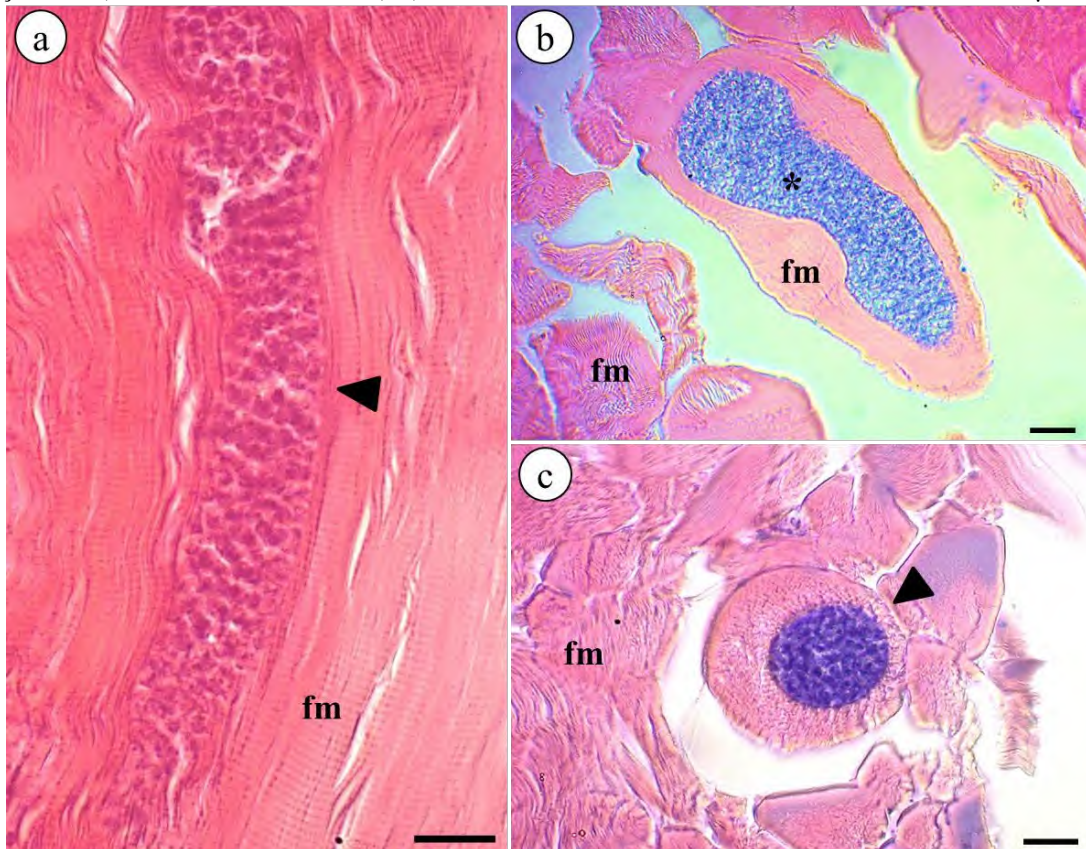
Espécie	Hospedeiro	Órgão Infectado	Formato do Esporo	CE	LE	CC	LC	Localidade	Referência
<i>Kudoa</i> sp.	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	Musculatura	Pseudoquadrado	5,14 (4,72-5,98)	7,80 (7,66-7,97)	2,30 (2,26-2,32)	1,71 (1,62-1,74)	Peixe-boi	Presente estudo
<i>Kudoa</i> sp.	<i>Trachycorystes porosus</i>	Musculatura	Pseudoquadrado	6,38 (6,20-6,87)	9,35 (9,10-9,78)	2,65 (2,47-2,74)	1,75 (1,73-1,77)	Cachoeira do Arari	Presente estudo
<i>Kudoa orbicularis</i>	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	Musculatura	Pseudoquadrado	4,65 (4,04-5,54)	5,25 (4,78-5,98)	2,22 (2,05-2,32)	1,53 (1,56-1,74)	Cachoeira do Arari	Presente estudo
<i>Kudoa orbicularis</i>	<i>Chaetobranchopsis orbicularis</i>	Musculatura	Pseudoquadrado	4,4 - 4,8	5,0 - 5,6	1,4 - 2,0	1,2 - 1,6	Cachoeira do Arari	Sindeaux-Neto et al., 2017
<i>Kudoa orbicularis</i>	<i>Chaetobranchopsis orbicularis</i>	Musculatura	Quadrado arredondado	4,3 (3,6-5,0)	5,1 (4,2-5,8)	2,1 (1,7-2,6)	1,3 (0,9-1,7)	Cachoeira do Arari	Azevedo et al., 2016
<i>Kudoa</i> sp.	<i>Plagioscion squamosissimus</i>	Musculatura	Quadrado Pseudoquadrado	5,63 (5,6-5,85)	5,60 (5,40-5,60)	1,75 (1,4-2,0)	0,98 (0,9-1,1)	Outeiro	Oliveira et al., 2015
<i>Kudoa aequidens</i>	<i>Aequidens plagiozonatus</i>	Musculatura Sub-Opercular	Quadrado Pseudoquadrado	3,2 (2,9-3,5)	6,8 (6,2-7,1)	2,2 (2,0-2,6)	1,2 (1,1-1,5)	Peixe-boi	Casal et al., 2007
<i>Kudoa</i> sp.	<i>Lutjanus analis</i>	Parede esôfago	Estrelado	4,7 (4-5)	7,8 (7-9)	3,2 (3-4)	1,4(1-1,5)	Aracajú, Sergipe	Eiras et al., 2016
<i>Kudoa inornata</i>	<i>Cynoscion nebulosus</i>	Musculatura	Quadrado arredondado	5,4 (5,3-5,5)	5,9 (5,8-6,0)	2,7	-	USA	Dyková et al., 2009
<i>Kudoa islandica</i>	<i>Anarhichas minor</i>	Musculatura	Quadrado arredondado	6,2 (5,5-6,8)	9,0 (8,6-9,5)	2,1 (1,7-2,4)	1,7 (1,5-1,9)	Iceland	Kristmundsson; Freeman, 2014
<i>Kudoa paralichthys</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Cérebro	Quadrado	5,19 (4,49-5,97)	8,23 (7,4-8,89)	2,2 (1,87-2,74)	1,2 (1-1,42)	Coréia do Sul	Cho; Kim, 2003

CE – Comprimento dos Esporos; LE – Largura dos Esporos; CC – Comprimento das Cápsulas Polares; LC - Largura das Cápsulas Polares.

Foi realizada análise da biologia molecular do *Kudoa* sp. encontrado nos exemplares de *T. galeatus* de Cachoeira do Arari, que juntamente com os dados morfológicos, indicaram que o parasito se tratava da espécie *K. orbicularis*, descrito anteriormente por Azevedo et al. (2016), e os dados dessas análises foram utilizados na elaboração de um artigo (Apêndice 01).

Pelas técnicas histológicas de coloração em Hematoxilina-Eosina e Ziehl-Neelsen utilizadas, pode-se observar a relação dos pseudocistos nas fibras musculares, que se encontravam na região intracelular do tecido, ocasionando deformidades das fibras ao seu redor, bem como a organização dos esporos que os formam (Figura 22).

Figura 22 - Fotomicrografia: Pseudocisto de *Kudoa* sp. (cabeça da seta) na musculares estriada esquelética, ocasionando deformidade entre as fibras musculares (fm) do hospedeiro, corado em HE; b) Observação de pseudocisto de *Kudoa* sp. (*) entre fibras musculares (fm) em corte longitudinal, corado em ZN; c) Pseudocisto (cabeça da seta) entre fibras musculares (fm) em corte transversal, corado em ZN. Barras de escala: 20 μ m.



Em algumas espécies, os pseudocistos encontram-se dentro das fibras musculares, ocasionando aumento significativo do comprimento dessas fibras, e quando o tecido muscular encontra-se intensamente infectado pelo parasito, acaba adquirindo um aspecto amolecido (LOM; DYKOVÁ, 1992).

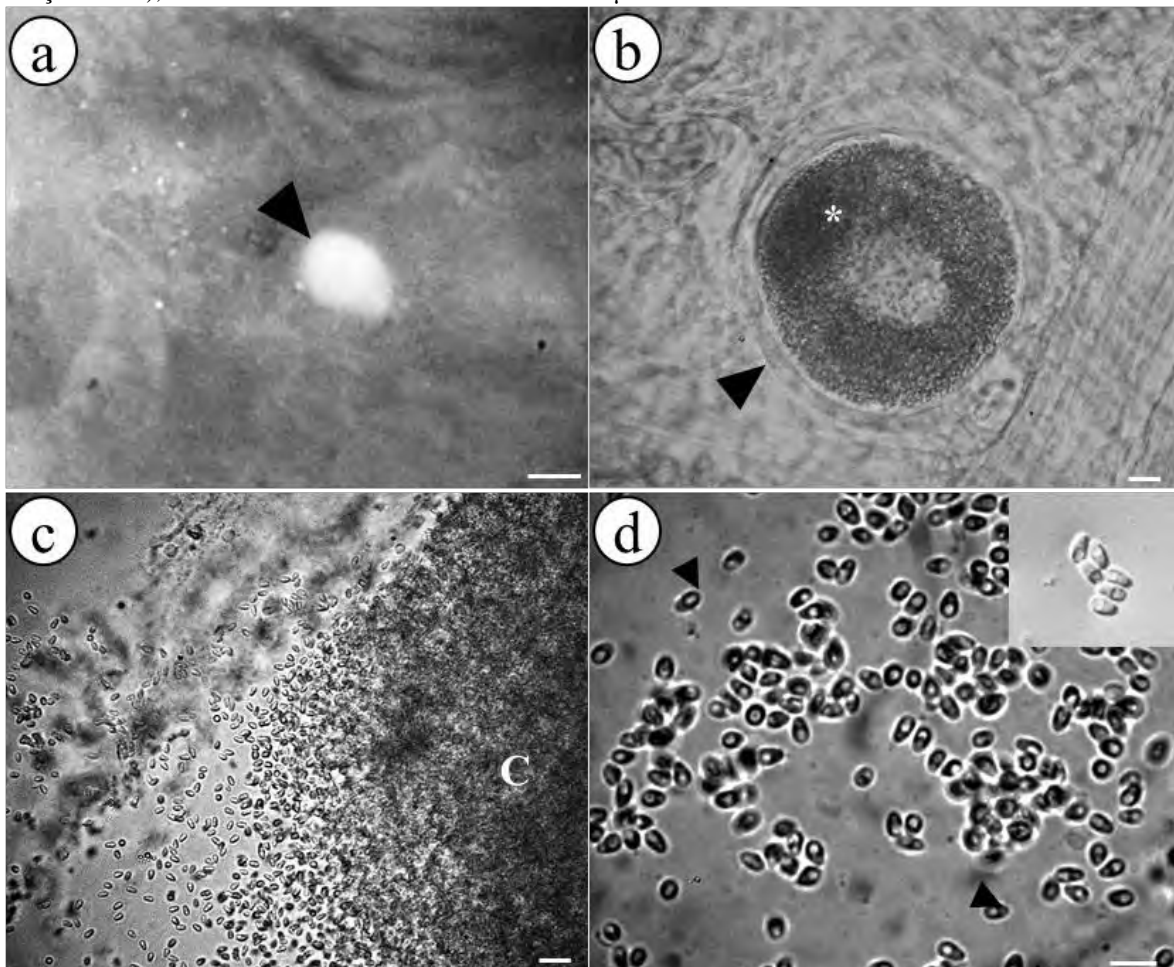
Contudo, apesar da presença do microparasito nas fibras musculares dos espécimes analisados, a musculatura não demonstrou sinais de mioliquefação, semelhante a Andrada et

al. (2005), que não observaram nenhuma reação de mioliquefação nos exemplares de *Trichiurus lepturus* que avaliaram; por Dyková, Avila e Fiala (2002) para musculatura do esôfago de *Sphoeroides annulatus* e Shirakash et al. (2014) para o tecido muscular de *Calotomus japonicus*.

5.4 Microsporídio na musculatura de *T. galeatus* e *T. porosus*

Na musculatura esquelética estriada dos espécimes foram observados pequenos cistos arredondados com parede espessa (Figura 23b), e quando comprimidos entre lâmina e lamínula liberaram inúmeros esporos (Figura 23c) identificados como pertencentes ao Filo Microsporídia com formato piriforme, apresentando esporoplasma e vacúolo posterior no interior (Figura 23d), não sendo possível observar o filamento polar e o número de voltas.

Figura 23 – Fotomacrografia: a) Cisto esbranquiçado de microsporídio (cabeça da seta). Barra de escala: 200 μm ; Fotomicrografia: b) Cisto arredondado de microsporídio (*) apresentando parede espessa. Barra de escala: 10 μm . c) Cisto rompido após compressão entre lâmina e lamínula (C). Barra de escala: 50 μm ; d) Inúmeros esporos piriformes de microsporídio livres após rompimento do cisto mostrando vacúolo posterior translúcido (cabeça da seta), com detalhe em DIC. Barra de escala: 05 μm .



Segundo Silva (2011), em muitos casos na aglomeração dos esporos, pode haver diferenciação em xenoma, que consiste em uma estrutura composta por uma célula hipertrófica cercada por uma parede espessa, constituída por várias camadas de colágeno, sendo que o núcleo hipertrófico, quando de grande dimensão apresenta-se, geralmente, com profundas ramificações (MATOS et al., 2003).

No presente estudo, observou-se em todos os hospedeiros a ocorrência de xenoma, porém apenas em *T. porosus* foi possível verificar a presença de xenoma macroscópico (Figura 24a). Semelhante ao descrito por Abdel-Ghaffar et al. (2011), que presenciaram cistos macroscópicos de microsporídios infectando músculo, tecido conjuntivo dos ovários e epitélio intestinal de *Saurida undosquamis*, musculatura e estômago de *Pagrus pagrus* e, cavidade peritoneal de *Epinephelus chlorostigma*.

A prevalência encontrada para esse microparasito foi de 35% (28/80) em *T. galeatus* de Peixe-boi, 31,3% (25/80) para os de Cachoeira do Arari e 28,8% (23/80) em *T. porosus*. Prevalências semelhantes foram encontradas para microsporídio na Amazônia, como 30% para *Loma psittaca* (CASAL et al., 2009), 34% para *Loma myrophis* (AZEVEDO; MATOS, 2002), 37,5% para *Amazonspora hassar* (AZEVEDO; MATOS, 2003a) e 36% para *Kabatana rondoni* (CASAL et al., 2010).

Porém, prevalências superiores já foram relatados em outros estudos de microsporídio na região amazônica, como 40,0% para *Potasporea morhaphis* (CASAL et al., 2008), 45% para *Microsporidium brevirostris* (MATOS; AZEVEDO, 2004), 60,0% de *Pleistophora beebei* (CASAL et al., 2016) e 66,6% para *Potasporea aequidens* (VIDEIRA et al., 2015), sendo estes microparasitos de hospedeiros oriundos do município de Peixe-boi.

Entre os hospedeiros analisados, as medidas dos esporos se mostraram bem próximas, principalmente entre os microsporídios encontrados nas espécies capturadas em Cachoeira do Arari. Quando comparados com outras espécies de microsporídios encontrados parasitando peixes da Amazônia, verificou-se que os valores morfométricos foram inferiores para as espécies *P. beebei* (CASAL et al., 2016), *K. rondoni* (CASAL et al., 2010), *L. psittaca* (CASAL et al., 2009) e superiores para *P. morhaphis* (CASAL et al., 2008), *M. brevirostris* (MATOS; AZEVEDO, 2004), *A. hassar* (MATOS; AZEVEDO, 2003a) (Tabela 6).

Tabela 6 - Medidas descritivas comparativas (médias, com intervalos entre parênteses: μm) dos microsporídios encontrados nos espécimes analisados com outras espécies descritas de microsporídio parasitando peixes da região amazônica.

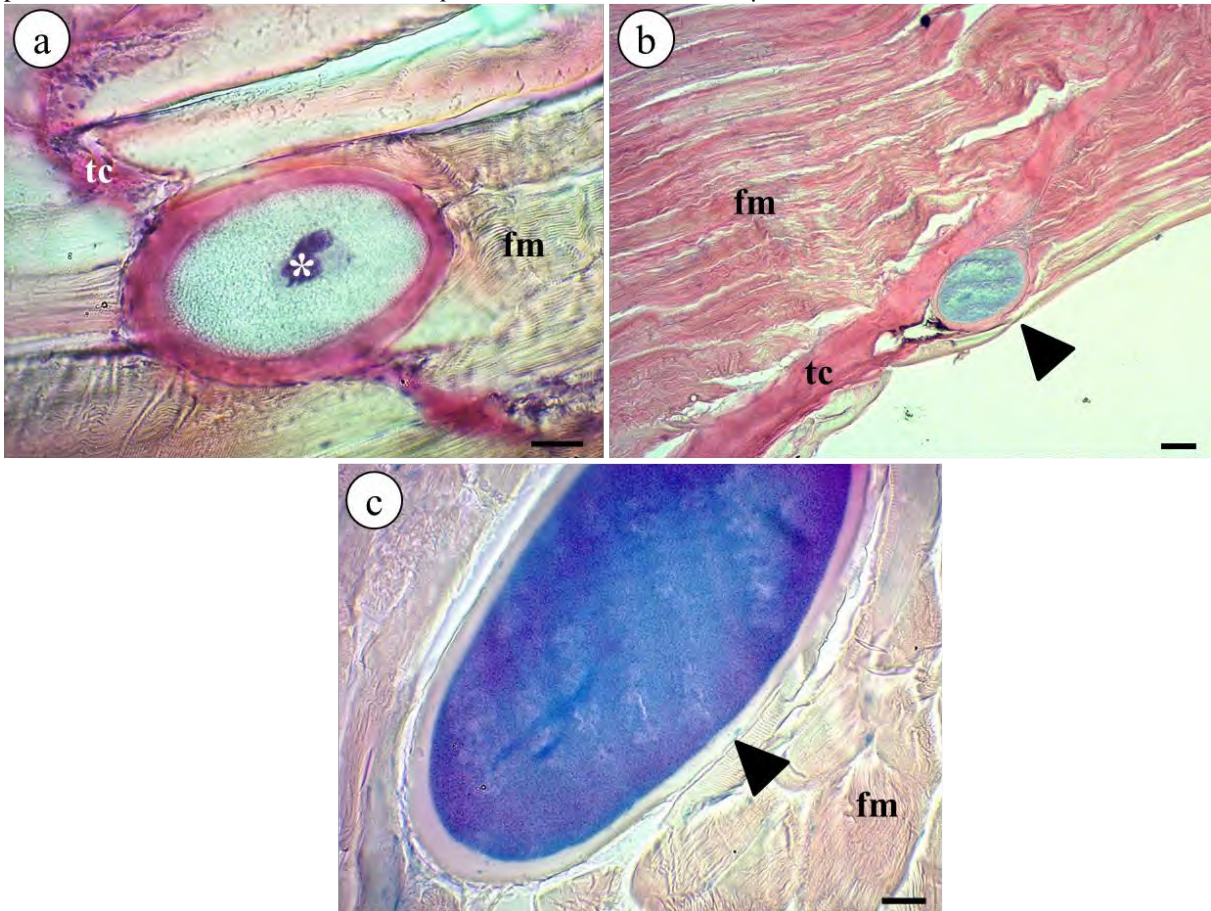
Espécie	Hospedeiro	Sítio de infecção	Formato dos Esporos	CE	LE	Localidade	Referências
Microsporidio	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	Musculatura	Elipsoide a piriforme	3,2 (2,88-3,67)	1,8 (1,64-2,8)	Peixe-boi	Presente estudo
Microsporidio	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	Musculatura	Elipsoide a piriforme	3,7 (3,5-4,0)	2,5 (1,90-2,7)	Cachoeira do Arari	Presente estudo
Microsporidio	<i>Trachycorystes porosus</i>	Musculatura	Elipsoide a piriforme	3,82 (3,69-4,02)	2,19 (2,07-2,36)	Cachoeira do Arari	Presente estudo
<i>Pleistophora beebei</i>	<i>Brachyhypopomus beebei</i>	Músculo da cavidade abdominal	Levemente alongados	4,7 (4,4-5,0)	2,8 (2,3-3,0)	Peixe-boi	Casal et al., 2016
<i>Potaspora aequidens</i>	<i>Aequidens plagiozonatus</i>	Região sub-opercular e nadadeiras	Elipsoide a piriforme	3,4	1,9	Peixe-boi	Videira et al., 2015
<i>Kabatana rondoni</i>	<i>Gymnorhamphichthys rondoni</i>	Músculo da cavidade abdominal	Elipsoide a piriforme	4,25	2,37	Irituia	Casal et al., 2010
<i>Loma psittaca</i>	<i>Colomesus psittacus</i>	Parede intestinal	Ovoide	4,2	2,8	Cametá	Casal et al., 2009
<i>Potaspora morhaphis</i>	<i>Potamorhaphis guianensis</i>	Cavidade celomática	Piriforme	2,8	1,5	Peixe-boi	Casal et al., 2008
<i>Microsporidium brevirostris</i>	<i>Brachyhypopomus brevirostris</i>	Músculo da cavidade abdominal	Elipsoide	2,95	1,68	Peixe-boi	Matos; Azevedo, 2004
<i>Amazonspora hassar</i>	<i>Hassar orestis</i>	Brânquias	Elipsoide	2,69	1,78	Cametá	Azevedo; Matos, 2003a
<i>Loma myrophis</i>	<i>Myrophis platyrhynchus</i>	Mucosa intestinal	Elipsoide	3,45 (3,22-3,70)	1,71 (1,59-1,81)	Algadoal	Azevedo; Matos, 2002

CE – Comprimento dos Esporos; LE – Largura dos Esporos.

As dimensões se aproximaram ao descrito para *P. aequidens* (VIDEIRA et al. 2015) e *L. myrophis* (AZEVEDO; MATOS, 2002), entretanto, os microsporídios referidos infectando a musculatura de *T. galeatus* e *T. porosus* oriundos do mesmo município, obtiveram comprimento e largura pouco mais elevados que estas duas espécies, e o contrário foi observado para os esporos encontrados em *T. galeatus* de Peixe-boi, que foram menores, tendo maior proximidade as medidas de *P. aequidens*.

Na microscopia de luz, os cortes histológicos dos tecidos com o microparasito foram corados em Hematoxilina-Eosina e Ziehl-Neelsen, e através delas foi visualizada melhor a relação do xenoma com a musculatura, assim como a organização dos esporos envoltos pela espessa camada do mesmo. Além do mais, foi possível perceber que os cistos de microsporídio não se localizavam somente na musculatura estriada (Figura 24c), mas também próximos a região de tecido conjuntivo presente no musculo (25a e 25b).

Figura 24 – Fotomicrografia: a) Cisto de microsporídio (*) próximo as fibras musculares (fm) e tecido conjuntivo (tc), corado em HE. Barra de escala: 50 μ m; b) Cisto (cabeça da seta) localizado entre fibras musculares (fm) e tecido conjuntivo (tc), corado em ZN. Barra de escala: 100 μ m; c) Cisto (cabeça da seta) presente entre as fibras musculares de *T. porosus*. Barra de escala: 50 μ m.



A ação deste microparasito pode ocasionar doenças aos organismos infectados, as denominadas microsporidioses, que por consequência causam a morte dos hospedeiros (CASAL, 2009). No presente estudo, a presença do microsporídeo na musculatura não demonstrou nenhuma doença aparente ao hospedeiro, porém verificou-se que ao redor do xenoma houve uma compressão/deformação e uma leve degradação do tecido muscular. Semelhante ao relatado por Casal et al. (2010) para *K. rondoni*, que verificaram degradação no músculo caracterizada pela desorganização das miofibrilas.

Segundo Casal et al. (2010), a localização do parasitismo é uma das características que deve ser levada em consideração, pois aparentemente, as espécies dentro de um gênero geralmente mostram especificidade de tecido ou órgão, por exemplo, todas as espécies do gênero *Microgemma* infectam o fígado; de *Spraguea* as células ganglionares dos tecidos nervosos, de *Kabatana* as fibras musculares esqueléticas, de *Pleistophora* as musculaturas esqueléticas e lisos, e quase todos os de *Loma* infectam filamentos branquiais.

Parte dos microsporídios que infectam a musculatura do hospedeiro podem acarretar danos nas células musculares circundantes, como é o caso da presença de microparasitos pertencentes às espécies do gênero *Kabatana* e *Pleistófora*, os quais induzem uma ação enzimática semelhante à observada em espécies de Myxozoa do gênero *Kudoa* (LOM et al., 1999).

Por se localizarem na musculatura dos seus hospedeiros, poderia se afirmar que as espécies encontradas no presente estudo pertenceriam ao gênero *Kabatana* ou *Pleistophora*. Porém, os dados morfométricos se assemelham a espécies do gênero *Potaspora* e *Loma*. Diante disso, para identificação segura das espécies dos microsporídios encontrados, é necessário realizar análises por técnicas ultraestruturais como microscopia eletrônica de varredura e transmissão, bem como por meio de biologia molecular.

Ressaltando, que os peixes podem servir como fonte de infecção por microsporídios para o homem, com isso, a identificação dos esporos desse microparasito pode reduzir e prevenir a sua exposição, principalmente para aqueles indivíduos que possuem maiores riscos de adquirir microsporidiose, como é o caso de pessoas que possuem a imunidade comprometida e crianças desnutridas (LOBO; TELES; CUNHA, 2003).

5.5 Análise dos parâmetros abióticos da água

A composição da comunidade parasitária, bem como a ocorrência de multiparasitismo, podem estar relacionados com os vários fatores do ambiente, desde os abióticos como a concentração de oxigênio, sazonalidade, pH e temperatura da água, até os bióticos como, a espécie hospedeira, seu comportamento, migrações, imunidade ou à interação entre estes fatores, seja em maior ou menor grau (TAVARES-DIAS et al., 2001; AZEVEDO, 2004; TAKEMOTO et al., 2004).

Durante a realização das coletas, as variáveis abióticas da água verificadas demonstraram que em Cachoeira do Arari o rio onde os exemplares foram capturados apresentou, em média, temperatura em torno de 28,3°C, pH de 5,0 e salinidade de 0,0 ‰, e por sua vez, no município de Peixe-Boi, o rio apresentou temperatura em torno de 27°C, pH de 6,10 e salinidade de 0,9 ‰, podendo perceber que não houve variação significativa dos parâmetros entre as áreas de captura.

No presente estudo percebeu-se uma variação da fauna parasitária presente nos hospedeiros conforme a sazonalidade decorrente do período chuvoso e seco, característico da região. Em ambos os municípios, verificou-se que a presença de microsporídeo na musculatura foi mais evidente nos exemplares capturados no período do chuvoso (Janeiro à Junho), por sua vez, os mixosporídios como *Ellipsomyxa* e *Myxobolus* foram mais evidenciados nos *T. galeatus* capturados no período seco (Julho à Dezembro). Exceção para o gênero *Kudoa*, que foi encontrado nos espécimes em ambos os períodos.

Segundo Carvalho et al. (2010), modificações nas condições do meio ambiente e do habitat dos hospedeiros podem ser determinantes nas variações da composição da fauna parasitária, as quais podem estar sujeitos à influência de possíveis ciclos sazonais.

6 CONCLUSÃO

Nos espécimes de *T. galeatus* de ambos os municípios, foi encontrada a mesma fauna microparasitária, composta por três representantes do Subfilo Myxozoa (*Myxobolus*, *Ellipsomyxa* e *Kudoa*) e um do Filo Microsporídia. Em *T. porosus* foi evidenciada a presença de microsporídios e *Kudoa* sp.

Myxobolus spp. foram encontrados parasitando as brânquias dos hospedeiros, apresentando prevalência significativa, localizando-se preferencialmente na região cartilaginosa do filamento branquial, ocasionando deformidades morfológicas.

Ellipsomyxa spp. foram evidenciados parasitando a vesícula biliar dos hospedeiros, demonstrando baixa prevalência e juntamente com os *Myxobolus* spp. apresentou maior incidência nos exemplares capturados nos meses de Julho a Dezembro.

Kudoa spp. foram observados entre as fibras da musculatura esquelética estriada dos exemplares analisados, todos demonstraram elevada prevalência e ocorreram em todo período de estudo, ocasionando deformidade das fibras ao redor do cisto.

Para os esporos de *Kudoa* encontrados em *T. galeatus* de Cachoeira do Arari, foi realizado análise em biologia molecular, e constatou-se que se tratava da espécie *K. orbicularis*, sendo a primeira descrição dessa espécie em um hospedeiro da ordem Siluriformes.

Na musculatura dos espécimes de *T. galeatus* e *T. porosus* também se evidenciou a presença de xenomas arredondados formados por esporos de microsporídios, provocando a compressão e leve degradação do tecido muscular dos hospedeiros. Para esse microparasito foi constata uma baixa prevalência nos hospedeiros, sendo encontrados com maior frequência durante o período de Janeiro a Junho.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GHAFFAR F.; BASHTAR A. R.; MEHLHORN, H.; AL-RASHEID, K.; MORSY, K. Microsporidian parasites: a danger facing marine fishes of the Red Sea. **Parasitology Research**, v. 108, n.1, p. 219-25. 2011.
- ABDEL-GHAFFAR, F.; MORSY, K.; MEHLHORN, H. et al. First report of *Kudoa* species (Myxozoa: Kudoidae) infecting the spotted coral grouper *Plectropomus maculatus* from the Red Sea. A light and ultrastructural study. **Parasitology Research**, v. 111, n.4, p. 1579-1585. 2012.
- ABRUNHOSA, J.; SINDEAUX-NETO, J.; SANTOS, A. K. D.; HAMOY, I.; MATOS, E. *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, n. 4, p. 465–471. 2017.
- ABRUNHOSA, J.; SINDEAUX-NETO, J. L.; SANTOS, S.; HAMOY, I.; MATOS, E. A new species of myxozoa in the skeletal striated musculature of *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) (Siluriforme: Pimelodidae) Amazonian fish, Marajó island, Brazil. **Zootaxa**, v. 4482, n. 1), p. 164–176. 2018.
- ADRIANO, E. A.; ARANA, S.; ALVES, A. L.; SILVA, M. R. M.; CECCARELLI, P. S.; SILVA, F.H.; MAIA, A. A. M. *Myxobolus cordeiroi* n. sp. a parasite of *Zungaro iahu* (Siluriforme: Pimelodidae) from Brazilian Pantanal: Morphology, phylogeny and histopathology. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n.3-4, p. 221-229. 2009a.
- ADRIANO, E. A.; ARANA, S.; CARRIERO, M. M.; NALDONI, J.; CECCARELLI, P. S.; MAIA, A. A. Light, electron microscopy and histopathology of *Myxobolus salminus* n. sp., a parasite of *Salminus brasiliensis* from the Brazilian Pantanal. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 25-29. 2009b.
- 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.
- ADRIANO, E. A.; ARANA, S.; CORDEIRO, N. S. *Myxobolus cuneus* n. sp. (Myxosporea) infecting the connective tissue of *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) in Brazil: histopathology and ultrastructure. **Parasite**, v. 13, p. 137-142, 2006.
- AGOSTINHO, A. A.; BINI, L. M.; GOMES, L. C.; JÚLIO JR, H. F.; PAVANELLI, C. S.; AGOSTINHO, C. S. Fish assemblages. In: THOMAZ, S. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. **Upper Paraná River and its Floodplain: physical aspects, ecology and conservation**. Leiden: Backhuys Publishers, 2004. p. 223-246.
- AKAMA, A. **Revisão sistemática dos gêneros *Parauchenipterus* Bleeker, 1862 e *Trachelyopterus* Valenciennes, 1840 (Siluriformes, Auchenipteridae)**. 2004. 375 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ALBERT, J. S.; REIS, R. E. Introduction of Neotropical Freshwater. In: ALBERT, J.S.; REIS, R.E. (Eds). **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. California: University of California Press, 1 ed., 2011. p. 3-19.

ALI, M. A.; ABDEL-BAKI, A. S.; SAKRAN, T.; ENTZEROTH, R.; ABDELGHAFAR, F. *Myxobolus lubati* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae), a new parasite of haffara seabream *Rhabdosargus haffara* (Forsskal, 1775), Red Sea, Egypt: a light and transmission electron microscopy. **Parasitol Research**, v. 100, p. 819-827. 2007.

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, p. 51-60. 2002.

ANDRADA, C. D. G.; TORTELLY, R.; NOGUEIRA, P. P. ANDRADE, C. L.; LIMA, F. C. Infecção por *Kudoa* Meglitsch, 1947 (Myxozoa: Multivalvulida) em musculatura esquelética de espada *Trichiurus lepturus* L. (Teleostei: Trichiuridae). **Parasitología latinoamericana**, v. 60, p. 150-153. 2005.

APPELTANS, W. AHYONG, S. T.; ANDERSON, G. ANGEL, M. V.; ARTOIS, T. et al., The magnitude os global marine species diversity. **Current Biology**, v. 22, p. 2189-2202. 2012.

ATKINSON, S. Estágio de vida do patógeno: Myxospore; Actinosporo. Versão Março de 2006. Disponível em: <<https://fishpathogens.net/image/generic-lifecyclegif>>. Acesso em: 25 de Novembro de 2018.

ATKINSON, S. D. **Diversity, life cycles and population genetics of freshwater Myxozoa from the Pacific Northwest of North America**. PhD Thesis, School of Chemistry & Molecular Bioscience, The University of Queensland, Australia, 220 p., 2011.

ATKINSON, S. D.; BARTHOLOMEW, J. L. Alternate spore stages of *Myxobilatus gasterostei*, a myxosporean parasite of three-spined stic klebacks (*Gasterosteus aculeatus*) and oligochaetes (*Nais communis*). **Parasitology Research**, v. 104, p. 1173–1181. 2009.

AZEVEDO C, CASAL G, MATOS P, MATOS E. A new species of Myxozoa, *Henneguya rondoni* n.sp. (Myxozoa), from the peripheral nervous system of the Amazonian fish, *Gymnorhamphichthys rondoni* (Teleostei). **Journal of Eukaryotic Microbiolog**, v. 55, p. 229-234. 2008.

AZEVEDO, C.; CASAL, G.; MARQUES, D.; SILVA, E.; MATOS, E. Ultrastructure of *Myxobolus brycon* n. sp. (Phylum Myxozoa), parasite of the piraputanga fish *Brycon hilarii* (Teleostei) from Pantanal (Brazil). **Journal of Eukaryotic Microbiolog**, v. 58, p. 88-93. 2011a.

AZEVEDO, C.; CORRAL, L.; MATOS, E. *Myxobolus desaequalis* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), Parasite of the Amazonian Freshwater Fish, *Apteronotus albifrons* (Teleostei, Apterotonidae). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 485-488. 2002.

AZEVEDO, C.; CORRAL, L.; MATOS, E. Ultrastructure of *Triangulamyxa amazonica* n. gen. and n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), a parasite of the Amazonian freshwater fish,

Sphoeroides freshwater fish, (Teleostei, Tetrodontidae). **European Journal of Protistology**, v. 41, p. 57–63. 2005.

AZEVEDO, C.; CASAL, G.; MATOS, P.; MATOS, E. *Henneguya torpedo* sp. nov. (Myxozoa), a parasite from the nervous system of the Amazonian teleost *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (Hypopomidae). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 93, p. 235-242. 2011b.

AZEVEDO, C.; CASAL, G.; MENDONÇA, I.; CARVALHO, E.; MATOS, P.; MATOS, E. Light and electron microscopy of *Myxobolus sciades* n. sp. (Myxozoa), a parasite of the gills of the Brazilian fish *Sciades herzbergii* (Block, 1794) (Teleostei: Ariidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 203-207. 2010.

AZEVEDO, C., CASAL, G., MENDONÇA, I., MATOS, E. Fine structure of *Henneguya hemiodopsis* sp. n. (Myxozoa), a parasite of the gills of the Brazilian teleostean fish *Hemiodopsis microlepes* (Hemiodontidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 975-979. 2009.

AZEVEDO, C. CASAL, G.; SÃO CLEMENTE, S. C.; LOPES, L. M. S.; MATOS, P.; ABDEL-BAKI, A. A.; OLIVEIRA, E.; MATOS, E. *Myxidium volitans* sp. nov., a parasite of the gallbladder of the fish, *Dactylopterus volitans* (Teleostei: Triglidae) from the Brazilian Atlantic coast: morphology and pathology. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 557-561. 2011c.

AZEVEDO, C.; MATOS, E. *Amazonspora hassar* n. gen. and n. sp. (Phylum Microsporídia, Fam. Glugeidae), a parasite of the amazonian teleost *Hassar orestis* (Fam. Doradidae). **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 2, p. 336-341. 2003a.

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

AZEVEDO, C.; MATOS, E. Fine structure of *Henneguya pilosa* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea), parasite of the Brazilian fish, *Serrasalmus altuvei* (Characidae). **Folia Parasitológica**, v. 50, p. 35-40. 2003b.

AZEVEDO, C.; MATOS, E. Fine structure of a new species, *Loma myrophis* (Phylum Microsporidia) parasite of the Amazonian fish *Myrophis plathyrynchus* (Teleostei, Ophichthidae). **European Journal of Protistology**, v. 37, p. 445-452. 2002.

AZEVEDO C.; RIBEIRO M.; CLEMENTE S. C.; CASAL G.; LOPES L.; MATOS P.; AL-QURASHY S. A.; MATOS E. Light and ultrastructural description of *Meglitschia mylei* n. sp. (myxozoa) from *Myleus rubripinnis* (Teleostei: Serrasalmidae) in the Amazon River system. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 525-8. 2011d.

AZEVEDO, C.; ROCHA, S.; MATOS, E.; OLIVEIRA, E.; MATOS, P.; AL-QURASHY, S.; et al. Ultrastructural and phylogenetic description of *Kudoa orbicularis* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida): a parasite infecting the muscle of the fish *Chaetobranchopsis orbicularis* (Teleostei: Cichlidae) in the Amazon Region. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 27-36. 2016.

AZEVEDO, C.; VIDEIRA, M.; CASAL, G.; MATOS, P.; OLIVEIRA, E.; AL- QURAI SHY, S.; MATOS, E. Fine Structure of the Plasmodia and Myxospore of *Ellipsomyxa gobioides* n. sp. (Myxozoa) Found in the Gallbladder of *Gobioides broussonnetii* (Teleostei: Gobiidae) from the Lower Amazon River. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 490-496. 2013.

AZEVEDO, R. K.; ABDALLAH, V. D.; LUQUE, J. L. Biodiversity of fish parasites from Guandu River, Southeastern Brazil: An ecological approach. **Neotropical Helminthology**, v. 5, n. 2, p. 185-199. 2011e.

AZEVEDO, R. K.; VIEIRA, D. H. M. D.; VIEIRA, G. H.; SILVA, R. J.; MATOS, E.; ABDALLAH, V. D. Phylogeny, ultrastructure and histopathology of *Myxobolus lomi* sp. nov., a parasite of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) from the Peixes River, São Paulo State, Brazil. **Parasitology International**, v. 63, n. 2, p. 303-307. 2014.

AZEVEDO, T. M. P. **Análise comparativa da parasitofauna e características hematológicas de *Oreochromis niloticus* mantido em sistema de cultivo integrado e intensivo no estado de Santa Catarina**. 2004. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004.

BALDAUF, S. L.; ROGER, A. J.; WENK-SIERFERT, I.; DOOLITTLE, W. F. A Kingdom-Level Phylogeny of Eukaryotes Based on Combined Protein Data. **Science**, v. 290, p. 972-976. 2000.

BARASSA, B.; CORDEIRO, N.; 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, Rio de Janeiro**, v. 98, n. 6, p. 761-765. 2003.

BARBOSA, T. M. F. **Dinâmica dos sistemas de produção familiares da Ilha de Marajó: o caso do município de Cachoeira do Arari**. 2005. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2005.

BAHRI, S.; ANDREE, K. B.; HEDRICK, R. P. Morphological and phylogenetic studies of marine *Myxobolus* spp. from mullet in Ichkeul Lake, Tunisia. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, p. 463-470. 2003.

BARTHEM, R. B. A pesca comercial no médio Solimões e sua interação com a reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. In: QUEIROZ, H. L.; CRAMPTON, W. G. R. **Estratégias para manejo de recursos pesqueiros em Mamirauá**. Goiás: Brasília, 1999. p. 72-107.

BARTHOLOMEW, J. L. ATKINSONA, S. D.; HALLETTA, S. L.; LOWENSTINEC, L. J.; GARNERD, M. M.; GARDINERE, C. H.; RIDEOUTF, B. A.; KEELG, M. K.; BROWN, J. D. Myxozoan parasitism in waterfowl. **International Journal of Parasitology**, v. 38, p. 1199-1207. 2008.

BECNEL, J. J.; ANDREADIS, T. G. Microsporidia in insects. In: WITTNER, M. **The microsporidia and microsporidiosis**. Washington, D.C: AMS Press, p. 1-6. 1999.

BÉKÉSI, L.; SZÉKELY, C.; MOLNÁR, K. Atuais conhecimentos sobre Myxosporea (Myxozoa), parasitas de peixes. Um estágio alternativo dos parasitas no Brasil. São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n.5, p. 271-276, 2002.

BELL, G.; BURT, A. The comparative biology of parasite species diversity: internal helminths of freshwater fish. **Journal of Animal Ecology**, v. 60, n. 3, p. 1047-1064. 1991.

BERTOLETTI, J. J.; PEZZI DA SILVA, J. F.; PEREIRA, E. H. L. A new species of catfish genus *Trachelyopterus* (Siluriformes, Auchenipteridae) from southern Brazil. **Revue Française d'Aquariologie**, v. 22, n. 3-4, p. 71-74, 1995.

BIGLIARDI, E.; SACCHI, L. Cell biology and invasion of the microsporidia. **Microbes and Infection**, v. 3, P. 373-379. 2001.

BIRINDELLI, J. L. O. Phylogenetic relationships of the South American Doradoidea (Ostariophysi: Siluriformes). **Neotropical Ichthyology**, V. 12, p. 451-564. 2014.

BORCEM, E. R.; FURTADO-JÚNIOR, I.; ALMEIDA, I. C.; PALHETA, M. K. S.; PINTO, I. A. A atividade pesqueira no município de Marapanim-Pará, Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 54, n. 3, p. 189- 201. 2011.

BORGES, S. A. G. V; GURGEL, H. C. B.; CANAN, B. Estrutura populacional de *Parauchenipterus galeatus* Linnaeus, 1766 (Siluriformes, Auchenipteridae), da Lagoa de Jiqui, Parnamirim, Rio Grande do Norte. **Revista CERES**, v. 46, n. 264, p. 209-218. 1999.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasília: MPA, 2011. 60 p.

BRITSKI, A. H.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal**: Manual de identificação. Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária. Brasília – DF, 1999. 184 p.

BRITSKI, A. H.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal**: Manual de identificação. 2ª Edição. Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária. Brasília, 2007. 227 p.

BRUNS, T. A kingdom revised. **Nature**. v. 443, p. 758-761, 2006.

BUCKUP, P. A. Biodiversidade dos Peixes da Mata Atlântica. In: **Base de Dados Tropical**. Eds. Biodiversity Patterns of South and Southeast Atlantic Rain Forest. 1998.

BUCKUP, P. A., MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional. (Série Livros; 23), 2007. 195 p.

CALI A.; TAKVORIAN P. M. Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. In: WITTNER, M; WEISS, L. M. **The Microsporidia and Microsporidiosis**. Washington, D.C.: AMS Press, 1999. p. 85-128.

- CALI A.; TAKVORIAN P. M.; WEISS, L. M. *Brachiola algerae* spore membrane systems, their activity during extrusion, and a new structural entity, the multilayered interlaced network, associated with the polar tube and the sporoplasm. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, p. 164–174. 2002.
- CAMPOS, C. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Histopathology of gills of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) infested by Monogenea and Myxosporea, caught in Aquidauana River, State of Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 67-70. 2011.
- CAPODIFOGGIO, K. R. H.; ADRIANO, E. A.; SILVA, M. R. M.; MAIA, A. A. M. 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.
- CARDIM, J.; SILVA, D.; HAMOY, I.; MATOS, E.; ABRUNHOSA, F. *Myxobolus bragantinus* n. sp. (Cnidaria: Myxosporea) from the gill filaments of the redeye mullet, *Mugil rubrioculus* (Mugiliformes: Mugilidae), on the eastern Amazon coast. **Zootaxa**, v. 4482, n. 1, p. 177–187. 2018.
- CARVALHO, A. R.; TAVARES, L. E. T.; LUQUE, J. L. Variação sazonal dos metazoários parasitos de *Geophagus brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae) no rio Guandu, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 2, p. 159-167. 2010.
- CASAL, G. **Microsporidioses e Myxosporidioses da ictiofauna portuguesa e brasileira: caracterização ultrastrutural e filogenética**. 2009. 267 f. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) - Universidade do Porto. Portugal, 2009.
- 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, p. 313-319. 2003.
- CASAL, G.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. A new myxozoan parasite from the Amazonian fish *Metynnus argenteus* (Teleostei, Characidae): light and electron microscope observations. **Journal of Parasitology**, v. 92, p. 817-82. 2006.
- CASAL, G.; MATOS, E.; MATOS, P.; AZEVEDO, C. Ultrastructural Description of a New Myxosporean Parasite *Kudoa aequidens* sp. n. (Myxozoa, Myxosporea), found in the Sub-Opercular Musculature of *Aequidens plagiozonatus* (Teleostei) from the Amazon River. **Acta Protozoologica**, v. 47, p. 135–141. 2008a.
- CASAL, G.; MATOS, E.; ROCHA, S.; SINDEAUX-NETO, J.; AL-QURAI SHY, S.; AZEVEDO, C. Ultrastructure and Phylogeny of *Pleistophora beebei* sp. nov. (Microsporidia) Infecting the Amazonian Teleostean *Brachyhyopomus beebei* (fam. Hypopomidae). **Acta Protozoologica**, v. 55, p. 259–268. 2016.
- CASAL, G.; MATOS, E.; TELES-GRILLO, M. L.; AZEVEDO, C. A new microsporidian parasite, *Potaspora morhaphis* n. gen., n. sp. (Microsporidia) infecting the Teleostean fish, *Potamorhaphis guianensis* from the River Amazon. Morphological, ultrastructural and molecular characterization. **Parasitology**, v. 135, p. 1053–1064. 2008b.

CASAL, G.; MATOS, E.; TELES-GRILO, M. L.; AZEVEDO, C. Morphological and genetical description of *Loma psittaca* sp. n. isolated from the Amazonian fish species *Colomesus psittacus*. **Parasitology Research**, v. 105, p. 1261-1271. 2009.

CASAL, G.; MATOS, E.; TELES-GRILO, M. L.; AZEVEDO, C. Ultrastructural and molecular characterization of a new microsporidium parasite from the amazonian fish, *Gymnorhamphichthys rondoni* (Rhamphichthyidae). **Parasitology**, v. 96, n. 6, p.1155–1163. 2010.

CAVALIER-SMITH, T. A revised six-kingdomsystem of life. **Biological Reviews**, v. 73, p. 203-266. 1998.

CHO, J. B.; KIM, K. H. Light- and electron-microscope description of *Kudoa paralichthys* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea) from the brain of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 55, n. 1, p. 59-63. 2003.

CLARK, G. T. Molecular approaches and techniques, in: WOO, P. T. K. **Fish diseases and disorders**: 1. Protozoan and metazoan infections, 2006. p.725-752.

COSTA, B. O. BITTENCOURT, M. M. A fecundidade de peixes Siluriformes em ambientes de várzea – um enfoque na ecologia reprodutiva desta comunidade na região Amazônica. In: Jornada de Iniciação Científica do PIBIC/CNPq/FAPEAM/INPA, 15. 2006, Manaus. **Anais...** Manaus, INPA, 2006. p. 215-216.

CURRENT, W.L. *Henneguya adipose* (Myxosporidia) in the channel catfish: ultrastructure of the plasmodium wall and sporogenesis. **The Journal of protozoology**, v. 26, n. 2, p. 209-17, 1979.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACGADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60 p.

DIDIER, E. S. Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. **Acta Tropica**, v. 94, p. 61-76. 2005.

DISCOVERLIFE. Ordem Siluriformes. Disponível em: <https://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make_map>. Acesso em: 23 Set. 2018.

DORIA, C. R. C.; RUFFINO, M. L.; HIJAZI, N. C.; CRUZ, R. L. A pesca comercial do Rio Madeira no Estado de Rondônia, Amazônia Brasileira. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 1, p. 29-40. 2012.

DYKOVÁ, I.; AVILA, E. J. F.; FIALA, I. *Kudoa diana* sp. n. (Myxosporea: Multivalvulida), a new parasite of bullseye puffer, *Sphoeroides annulatus* (Tetraodontiformes: Tetraodontidae). **Folia Parasitologica**, v. 49, p. 17-23. 2002.

DYKOVÁ, I.; BURON, I.; FIALA, I.; ROUMILLAT, W. R. *Kudoa inornata* sp. n. (Myxosporea: Multivalvulida) from the skeletal muscles of *Cynoscion nebulosus* (Teleostei: Sciaenidae). **Folia Parasitologica**, v. 56, p. 91–98. 2009.

EDEMA, C. U.; OKAKA, C. E.; OBOH, I. P.; OKOGUB, B. O. A preliminary study of parasitic infections of some fishes from Okhuo River, Benin City, Nigeria. **International Journal of Biomedical and Health Sciences**, v. 4, n. 3, p. 107-112. 2008.

EIRAS, J. C. Aspectos gerais da patologia das parasitoses de peixes marinhos. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T., TAKEMOTO, R. M., LIZAMA, M. A. P. In: **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004. 143-156p.

EIRAS, J. C. **Elementos de Ictioparasitologia**. Porto: Fundação Eng. António de Almeida, 1994. 339p.

EIRAS, J. C.; PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M. *Henneguya paranensis* sp. n. (Myxozoa, Myxobolidae), a parasite of the teleost fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the Paraná river, Brazil. **Bulletin European Association of Fish Pathologists**, v. 24, n. 6, p. 308-311. 2004.

EIRAS, J. C., TAKEMOTO, R. M., PAVANELLI, G. C. **Diversidade dos parasitas de água doce do Brasil**. Maringá: Ed. Clichetec, 2010. 333p.

EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C.; ADRIANO, E. A. About the biodiversity of parasites of freshwater fish from Brazil. **Bulletin European Association of Fish Pathologists**, v. 31, n. 4, p. 161-168. 2011.

EIRAS, J. C.; FUJIMOTO, R. Y.; MADI, R. R.; JERALDO, V. L. S.; MELO, C. M.; SOUZA, J. S.; DINIZ, J. A. P.; DINIZ, D. G. *Kudoa* spp. (Myxozoa, Multivalvulida) parasitizing fish caught in Aracaju, Sergipe, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 429-434. 2016.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. Species by family/subfamily. In: ESCHMEYER, W. N. (Ed.). **Catalog of fishes. California, California Academy of Sciences**. Online version. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>. Acesso em: 22 Dezembro de 2018.

FABRÉ, N. N.; ALONSO, J. C. Recursos ícticos no Alto Amazonas: sua importância para as populações ribeirinhas. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 14, n. 1, p. 19-55. 1998.

FEIJÓ, M. M.; ARANA, S.; CECCARELLI, P. S.; ADRIANO, E. A. Light and scanning and histology of infected sites in pirarucu (*Arapaima gigas*: Pisces: Arapaimidae) from the Araguaia River, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p. 59-64. 2008.

FEIST, S. W.; LONGSHAW, M. Phylum Myxozoa. In: WOO, P. T. K. **Fish Diseases and Disorders**. Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections, 2^a Edition. UK: CAB International. 2006. 230-296 p.

FERGUSON, J. A.; ATKINSON, S. D.; WHIPPS, C. M.; KENT, M. L. Molecular and morphological analysis of *Myxobolus* spp. of salmonid fishes with the description of a new *Myxobolus* species. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 1322-1334. 2008.

- FERRARIS-JR, C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, v. 1418, p. 1-628. 2007.
- FERRE, I. Anisakiosis y otras zoonosis parasitarias transmitidas por consume de pescado. **Aquatic**, v. 14, p. 1-21. 2001.
- FIALA, I. The phlogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 1521-1534. 2006.
- FIALA, I.; BARTOŠOVÁ-SOJKOVÁ, P.; WHIPPS, C. M. Classification and Phylogenetics of Myxozoa. In: **Myxozoan Evolution, Ecology and Development**. Springer International Publishing. Switzerland, 2015.
- FIGUEIREDO, E. T. L. **Entomopatogénios e bio-insecticidas. Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica**. Universidade Técnica de Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, 1997. 355p.
- FINK, W. L.; FINK, S. V. Central Amazonia and its fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 62, n.1, p. 13-29. 1978.
- FRANZEN C. Microsporidia: how can they invade other cells? **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 275–279. 2004.
- FRANZEN, C.; MÜLLER, A. Molecular Techniques for Detection, Species Differentiation, and Phylogenetic Analysis of Microsporidia. **Clinical Microbiology Review**, v. 12, p. 243-285. 1999.
- FUENTES, V.; RUMIZ, D. I. Estudio preliminar de la ictiofauna y los hábitats acuáticos del Río Bajo Paraguá, Santa Cruz, Bolivia. Santa Cruz, Bolivia. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 1, p. 73-81. 2008.
- GALLETI, S. R.. Introdução à microscopia eletrônica. **Biológico**, v. 65, n. 1/2, p. 33-35. 2003.
- GASALLA, M. A.; YKUTA, C. **Revelando a pesca de pequena escala**. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. São Paulo: LabPesq Impresso no Brasil Printed in Brazil, 2015. 15p.
- GOLDSTEIN, J. I.; NEWBURY D. E.; ECHIL P.; JOY, D. C.; ROMIG JR A. D.; LYMAN, C. E.; FIORI, C.; LIFSHIN, E. **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis**. New York: Plenum Press, 1992.
- GOMIERO, L. M.; SOUZA, U. P; BRAGA, F. M. S. Condition factor of *Astyanax intermedius* Eigenmann, 1908 (Osteichthyes, Characidae) parasitised by *Paracymothoa astyanaxi* Lemos de Castro, 1955 (Crustacea, Cymothoidae) in the Grande River, Serra do Mar State Park - Santa Virgínia Unit, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 2, p. 379-388. 2012.
- GOULDING, M.; BARTHEM, R.; FERREIRA, E. **The Smithsonian Atlas of the Amazon**. Washington: Smithsonian Books, 2003. 246p.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do Alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: Eduem, 2007. 241p.

GRIFFIN, M. J.; POTE, L. M.; WISE, D. J.; GREENWAY, T. E.; MAUEL, M. J.; CAMUS, A. C. A novel *Henneguya* species from channel catfish described by morphological, histological, and molecular characterization. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 20, p. 127-135. 2008.

GRIMSTONE, A. V. **O Microscópio Eletrônico em Biologia**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universidade Ltda; Editora da Universidade de São Paulo, 1980.

HALL, T. BioEdit. Biological Sequence Alignment Editor for Win95/98/NT/2K/XP. Carlsbad, CA: Ibis Biosciences. 2007. Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>> Acesso em: 20 de set de 2017.

HAWKINS, W.E.; OVERSTREET, R.M & PROVANCHA, M. J. Effects of space shuttle exhaust plumes on gills of some estuarine fishes: a light and electron microscopic study. **Gulf Research Reports**, v. 7, p. 197-309. 1984.

HEINIGER, H.; ADLARD, R. D. Relatedness of novel species of *Myxidium* Butschli, 1882, *Zschokkella* Auerbach, 1910 and *Ellipsomyxa* Køie, 2003 (Myxosporea: Bivalvulida) from the gall bladders of marine fishes (Teleostei) from Australian waters. **Syst Parasitology**, v. 87, p. 47–72. 2014.

HELFMAN, G. S. **Fish Conservation: A Guide to Understanding and Restoring Global Aquatic Biodiversity and Fishery Resources**. Washington, USA, 2007. 584p.

HOLINK A. S.; KAMBOUR R. P.; FINK D. G.; HOBBS .Y. **Microstructural science**, v. 7. 1979.

ISAAC, V. J. Exploração e manejo dos recursos pesqueiros do litoral amazônico: um desafio para o futuro. Brasil, 2010. Disponível em: <<http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v58n3>>. Acesso em: 27 Set. 2018.

ITIS, Integrated Taxonomic Information System. Disponível em: <<https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt#null>>. Acesso em: 25 Jan. 2019.

IWANOWICZ, L. R.; IWANOWICZ, D. D.; POTE, L. M.; BLAZER, V. S.; SCHILL, W. B. Morphology and 18S rDNA of *Henneguya gurlei* (Myxosporea) from *Ameriurus nebulosus* (Siluriformes) in North Carolina. **Journal Parasitology**, v.129, n.1, p.46-47. 2008.

JAMES, T. Y. et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, p. 818-822. 2006.

KAWAI, T.; SEKIZUKA, T.; YAHATA, Y.; KURODA, M.; KUMEDA, Y.; IJIMA, Y.; KAMATA, Y.; SUGITA-KONISHI, Y.; OHNISHI, T. 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: p. 1046–1052. 2012.

KEELING, P. J.; FAST, N. M. Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 93-116. 2002.

KENT, M. L.; ANDREE, K. B.; BARTHOLOMEW, J. L.; EL-MATBOULI, M.; DESSER, S. S.; DEVLIN, R. H.; FEIST, S. W.; HEDRICK, R. P.; HOFFMANN, R. W.; KHATTRA, J.; HALLETT, S. L.; LESTER, R. J. G.; LONGSHAW, M.; PALENZEULA, O.; SIDDALL, M. E.; XIAO, C. Recent Advances in Our Knowledge of the Myxozoa. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, n. 4. 2001.

KEOHANE E. M., WEISS L. M. The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. In: Wittner M.; Weiss, L. M. **The Microsporidia and Microsporidiosis**. Washington, D.C.: AMS Press, 1999. 196–224p.

KØIE, M. *Ellipsomyxa gobii* gen. et sp. n. (Myxozoa: Ceratomyxidae) in the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei: Gobiidae) from Denmark. **Folia Parasitologica**, v. 50, p. 269-271. 2003.

KØIE, M.; KARLSBAKK, E. *Ellipsomyxa syngnathi* sp. n. (Myxozoa, Myxosporea) in the pipefish *Syngnathus typhle* and *Syngnathus rostellatus* (Teleostei, Syngnathidae) from Denmark. **Parasitology Research**, v. 105, p. 1611–1616. 2009.

KRISTMUNDSSON, Á.; FREEMAN, M. A. Negative effects of *Kudoa islandica* n. sp. (Myxosporea: Kudoidae) on aquaculture and wild fisheries in Iceland. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wild life**, v. 3, p. 135–146. 2014.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M. M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. COPYRIGHT. 4^a edição. (Coleção piscicultura avançada). Jundiaí, São Paulo, 2004. 110p.

LAGRUE, C.; KELLY, D. W.; HICKS, A.; POULIN, R. Factors influencing infection patterns of trophically transmitted parasites among a fish community: host diet, host-parasite compatibility or both? **Journal of Fish Biology**, v. 79, p. 466–485. 2011.

LEE, S. C.; CORRADI, N.; BYRNES, E. J.; TORRES-MARTINEZ, S.; DIETRICH, F. S.; KEELING, P. J.; HEITMAN, J. Microsporidia evolved from ancestral sexual Fungi. **Current Biology**, v. 18, p. 1675-1679. 2008.

LÉVÊQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY M. L. J.; TEDESCO, P. A. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 545-567. 2008.

LEWIS, L. C.; SUMERFORD, D. V.; BING, L. A.; GUNNARSON, R. D. Dynamics of *Nosema pyrausta* in natural populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*: A six-year study. **BioControl**, v. 51, p. 627-642. 2006.

LOBO, M.L.; TELES, A.; CUNHA, M.B. et al. Microsporidia detection in stools from pets and animals from the zoo in Portugal: a preliminary study. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, p. 581-582. 2003.

- LOM, J. Notes on the ultrastructure and sporoblast development in fish parasitizing myxosporidian of the genus *Sphareomyxa*. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie**, v. 97, p. 416-437. 1969.
- LOM, J.; DYKOVÁ, I. Myxozoan genera: Definition and notes on taxonomy, lifecycle terminology and pathogenic species. **Folia Parasitologica**, v. 53, p. 1-36. 2006.
- LOM, J.; DYKOVÁ, I. Protozoan Parasites of Fishes. Development in Aquaculture and Fisheries Science. Amsterdam: **Elsevier**. v. 26, p. 315. 1992.
- LOM J., DYKOVÁ I. Ultrastructure of *Nucleospora secunda* n. sp. (Microsporidia), parasite of enterocytes of *Nothobranchius rubripinnis*. **European Journal of Protistology**, v. 38, p. 19-27. 2002.
- LOM J., DYKOVÁ I., TONGUTHAI K. *Kabataia* gen. n., a new genus proposed for *Microsporidium* spp. infecting trunk muscles of fishes. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 38, p. 39-46. 1999.
- LOM, J.; NILSEN, F. Fish Microsporidia: Fine structural diversity and phylogeny. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 107-127. 2003.
- LOPES, L. P. C. **Composição e estrutura da comunidade parasitária associada às espécies do gênero *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862) (Siluriformes: Pimelodidae) da Amazônia Central, Brasil**. 2006. 44 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2006.
- LUNA L.G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3^aed., New York: MacGraw-Hill Book Company, 1968.
- LUNDBERG, J. G.; FRIEL, J. P. Siluriformes. Catfishes. Version 20 January 2003 (under construction). In The Tree of Life Web Project. Disponível em: <<http://tolweb.org/http://tolweb.org/Siluriformes/15065/2003.01.20>>. Acesso em: 01 Nov. 2018.
- LUQUE, J. L. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n.1, p.161-5. 2004.
- LUQUE, J. L.; PEREIRA, F. B.; ALVES, P. V.; OLIVA, M. E.; TIMI, J. T. Helminth parasites of South American fishes: current status and characterization as a model for studies of biodiversity. **Journal of Helminthology**, v. 91, n. 2, p. 1–15. 2016.
- MACHADO, M. H.; PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M. **Introdução ao estudo dos parasitas de peixes**. **Apostila**. Universidade Estadual de Maringá: Nupélia, 1996.
- MADI, R. R.; UETA, M. T. Parasitas de peixes como indicadores ambientais. In: SILVA-SOUZA, A. T., LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M. **Patologia e sanidade de organismos aquáticos**. Maringá: Ed. Massoni, 2012. 33-58p.

MAGALHÃES, N.; LOBO, M. L.; ANTUNES, F.; MATOS, O. Aves e Cães como Potencial Fonte de Infecção Zoonótica por Microsporídeos para o Homem. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 69-75. 2006.

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.

MARCOGLIESE, D. J.; CONE, D. K. Parasite communities as indicators of ecosystem stress. **Parassitologia**, v. 39, p. 227-232. 1997.

MARIGUELA, T. C. **Análise filogenética da subfamília Callichthyinae (Teleostei: Siluriformes: Callichthyidae) com base em sequências de DNA nuclear e mitocondrial**. 2006. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2006.

MATHEWS, P. D.; MAIA, A. A. M.; 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. R. **Caracterização de aspectos morfológicos e ultraestruturais do ciclo de vida de microsporídios encontrados em peixes da região amazônica**. Belém, 2007. 135f. Originalmente apresentada como Tese de Doutorado. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. 2007.

MATOS, E.; MATOS, P.; CASAL, G.; GIESE, E.; CORRAL, L.; AZEVEDO, C. Dados ultraestruturais de microsporídios (Phylum Microsporidia) da fauna ictiológica da Região Amazônica. **Revista de Ciências Agrárias**, n. 39, p. 95-108. 2003.

MATOS, E.; VIDEIRA, M.; VELASCO, M.; SANCHES, O.; SÃO CLEMENTE, S. C.; MATOS, P. 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.

MARCIEL, E. C. S. **Uso de marcadores ribossomais para caracterização de *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet, 1876) procedentes de diferentes regiões do Brasil**. 2016. 59 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2016.

MARTINS, M. L.; SOUZA, V. N. *Henneguya piaractus* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae), a gill parasite of *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae), in Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 57, p. 239–245. 1997.

MARTINS, M. L.; SOUZA, V. N.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Gill infection of *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Osteichthyes: Anostomidae) by *Henneguya leporinicola* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae). Description, Histopathology and Treatment. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, p. 527-534. 1999.

MATOS, E.; AZEVEDO, C. Ultrastructural description of *Microsporidium brevirostris* spp. n. parasite of the teleostean *Brachyhypopomus brevirostris* (Hypopomidae) from the Amazon river. **Acta Protozoology**, v. 43, p. 261-267. 2004.

MATOS, E.; AZEVEDO, C.; CORRAL, L.; CASAL, G.; MATOS, P. Ultraestrutura de protozoários de peixes da região amazônica. **Acta Amazônica**. Belém, v. 29, p. 575-585. 1999.

MATOS, E., CASAL, G., MATOS, P., CORRAL, L., AZEVEDO, C. Microrganismos Parasitas de Animais Aquáticos da Amazônia. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T., TAKEMOTO, R. M., LIZAMA, M. A. P. **Sanidades de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Editora Varela, 2004. 158-178p.

MATOS, E.; CORRAL, L.; AZEVEDO, C. Ultrastructural details of the xenoma of *Loma myrophis* (Phylum Microsporidia), and extrusion of the polar tube during autoinfection. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 54, p. 203-207. 2003.

MATOS, E.; CORRAL, L.; MATOS, P.; CASAL, G.; AZEVEDO, C. 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**, n. 36, p.83-99. 2001.

MATOS, E.; MATOS, P.; CASAL, G.; GIESE, E.; CORRAL, L.; AZEVEDO, C. Dados ultraestruturais de microsporídios (Phylum Microsporidia) da fauna ictiológica da Região Amazônica. **Revista de Ciências Agrárias**, n. 39. p. 95-108. 2003.

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.

MENEZES, N. A.; WEITZMAN, S. H.; BURNS, J. R. A systematic review of *Planaltina* (Teleostei: Characiformes: Characidae: Glandulocaudinae: Diapomini) with a description of two new species from the upper river Paraná, Brazil. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 116, n. 3, p. 557-600. 2003.

MENEZES, P. J. LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C. G. Genetic variability in rDNA ITS region of *Trichoderma* spp. (biocontrole 56uarto) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi* isolates. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 132-139. 2009.

MILANIN, T. **Taxonomia morfológica e molecular de Myxosporea parasito de *Brycon hilarii*, oriundo do pantanal matogrossense**. 2011. 51 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

MILANIN, T. et al. Phylogeny, ultrastructure, histopathology and prevalence of *Myxobolus oliverai* n. sp., parasite of *Brycon hilarii* (Characidae) in the Pantanal wetland, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 762-9. 2010.

MOREIRA, G. S. A. **Taxonomia, filogenia e interação parasita-hospedeiro na infecção de mixosporídeos em piapara (*Leporinus obtusidens*) e dourado (*Salminus brasiliensis*) oriundos do rio Mogi Guaçu, São Paulo, Brasil**. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2013.

MORRIS, D. J. Cell formation by myxozoan species is not explained by dogma. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 177, p. 2565-2570. 2010.

MURIEL-CUNHA, J. **Biodiversidade e sistemática molecular de Phreatobiidae (Ostariophysi, Siluriformes) – com uma proposta sobre sua posição filogenética em Siluriformes e uma discussão sobre evolução do hábito subterrâneo.** 2008. 144 f. Tese (Doutorado em Ciência/Biologia - Genética) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação.** 1. ed. Maringá: Nupélia, 2003. 378p.

NALDONI, J.; ARANA, S.; MAIA, A. A. M.; CECCARELLI, P. S.; TAVARES, L. E.; BORGES, F. A.; POZO, C. F.; ADRIANO, E. A. *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a South American catfish: histopathology and ultrastructure. **Veterinary Parasitology**, v. 166, p. 52–59. 2009.

NALDONI, J.; ARANA, S.; MAIA, A. A. M.; SILVA, M. R. M.; CARRIERO, M. M.; CECCARELLI, P. S.; TAVARES, L. E. R.; ADRIANO, E. A., Host-parasite-environment relationship, morphology and molecular analyses of *Henneguya eirasi* n. sp. parasite of two wild *Pseudoplatystoma* spp in Pantanal Wetland, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 247-255. 2011.

NALDONI, J.; MAIA, A. A. M.; CORREA, L. L.; SILVA, M. R. M.; ADRIANO, E. A. Two new myxosporean species parasite of *Phractocephalus hemioliopterus* from the Brazilian Amazon: morphology, ultrastructure and SSU-rDNA sequencing. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.128, p. 37–49. 2018.

NELSON, J. S. **Fishes of the world.** 4º edição. New York, John Wiley & Sons, Inc, 2006. 601p.

OKAMURA, B.; GRUHL, A.; BARTHOLOMEW, J. L. **Myxozoan evolution, ecology and development.** Switzerland: Springer International Publishing, 2015. 441p.

OKUMURA, M. P. M.; PÉREZ, A. C. A.; ESPÍNDOLA FILHO, A. Principais zoonoses parasitárias transmitidas por pescado – revisão. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 2, n. 2, p. 66-80. 1999.

OLIVEIRA, J. C. VELASCO, M.; SANTOS, P. F. S.; SILVA, J. M. V.; CLEMENTE, S. C. S.; MATOS, E. *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.

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

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento.** 3 Ed. Maringá: Eduem, 2008. 311p.

PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M.; EIRAS, J. C. **Parasitologia de Peixes de Água Doce do Brasil.** Maringá: EDUM, 2013. 452p.

PEREIRA, I. L. **Estudo Ictioparasitário em Espécies de Interesse Econômico *Brachyplatystoma filamentosum* (lichtenstein, 1819) e *Curimata cyprinoides* (linnaeus, 1766) no Município de Ponta de Pedras, Ilha de Marajó, Pará.** 2017. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal rural da Amazônia, 2017.

PINHEIRO, L. S.; FRÉDON, F. L. Caracterização geral da pesca industrial desembarcada no Estado do Pará. **Revista Científica da UFPA**, v. 4. 2004.

PINNA, M. C. C. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes: historical overview and synthesis of hypothesis. In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, C. A. S. **Phylogeny and classification of Neotropical Fishes.** Porto Alegre: Edpurcs, 1998. 279-330p.

RAINHA, F. A. A Pesca Artesanal Brasileira: Uma Análise da Produção Pesqueira em Diferentes Escalas. In: Congresso Brasileiro de Geógrafos, 7, 2014, Vitória/ES, **Anais.** Vitória: CBG, 2014. 12p.

RAMOS, T. M. **Potencialidades da microscopia eletrônica (transmissão e varredura) e microscopia confocal como ferramentas para análises de amostras biológicas.** 2013. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Rio Grande Do Sul. Porto Alegre, 2013.

REIS, R. E.; KULLANDER, O.; FERRARIS-JR, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 742p.

ROBERTS, R. J. **Fish pathology.** London: W.B. Saunders, 2001. 472 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, p. 273-278. 1992.

RODRIGUES, T. E.; SILVA, J. M. L.; VALENTE, M. A.; SANTOS, E. S.; ROLLIN, P. A. M. **Caracterização e classificação dos solos do Município de Peixe-Boi, Estado do Pará.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. 43p.

SALIM, K. Y.; DESSER, S. S. Description and phylogenetic systematic of *Myxobolus* spp. From Cyprinids in Algonouin Park Ontario. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.47, p.309-318, 2000.

SAMPAIO, A. R. **Potencialidade, abundância e virtuosismo dos peixes: pesca, cultivo e ornamentais.** Fortaleza: Premium, 2012. 144p.

SANCHES, P. V.; NAKATANI, K.; BIALESTZKI, A. Morphological description of the developmental stages of *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes, Auchenipteridae) on the floodplain of the upper Paraná River. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. (3), p. 429-428. 1999.

SANTOS, G. M.; MERONA, B.; JURAS, A. A.; JÉGU, M. **Peixes do Baixo Rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí/ Brasília: Eletronorte,** 2004. 216p.

SANTOS, M. N. S. **Fauna Microparasitária de Peixes *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) Capturados nos Municípios de Cachoeira do Arari e Salvaterra, Ilha de Marajó/Pa.** 2016. 65 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais) – Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, 2016.

SÃO CLEMENTE, S. C.; PEREIRA JUNIOR, J.; KNOFF, M.; SILVA, C. M.; FERNADEZ, J. G.; COUSIN, J. C. *Hepatoxylon trichiuri* (Holten, 1802) Dollfus, 1942 (Eucestoda: Trypanorhyncha) of *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), from the coast of state of Rio Grande do Sul, and of *Coryphaena hippurus* Linnaeus, 1758, from the coast of State of Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitología al Día**, v. 25, p. 3-4. 2001.

SHIRAKASHI, S.; YAMANE, K.; ISHITANI, H.; YANAGIDA, T.; YOKOYAMA, H. First report of *Kudoa* species in the somatic muscle of the Japanese parrotfish *Calotomus japonicus* (Scaridae) and a description of *Kudoa igami* n. sp. (Myxozoa: Multivalulida). **Parasitology Research**, v. 113, p. 2515–2524. 2014.

SHPIRER, E.; CHANG, E.; DIAMANT, A.; RUBINSTEIN, N.; CARTWRIGHT, P.; HUCHON, D. Diversity and evolution of myxozoan minicollagens and nematogalectins. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, p. 205. 2014.

SIDDALL, M. E.; MARTIN, D. S.; BRIDGE, D.; DESSER, S. S.; CONE, D. K. The demise of a Phylum of Protists: Phylogeny of Myxozoa and other parasitic Cnidaria. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 6, p. 961-967. 1995.

SILVA, A. M.; LIMA, L. C. **Caracterização fisiográfica da bacia do rio Peixe-Boi.** 2000. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Engenharia Civil) - Universidade da Amazônia/Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Belém, 2000.

SILVA, A. M. O.; TAVARES-DIAS, M.; FERNANDES, J. S. Helminthes parasitizing *Semaprochilodus insignis* Jardine, 1841 (Osteichthyes: Prochilodontidae) from the central Amazonia (Brazil), and their relationship with the host. **Neotropical Helminthology**, v. 5, n. 2, p. 225-233. 2011.

SILVA, D. T.; MATOS, P. S.; LIMA, A. M.; FURTADO, A. P.; HAMOY, I.; MATOS, E. R. *Ellipsomyxa arariensis* n. sp. (Myxozoa: Ceratomyxidae), a new myxozoan parasite of *Pygocentrus nattereri* Kner, 1858 (Teleostei: Characidae) and *Pimelodus ornatus* Kner, 1858 (Teleostei: Pimelodidae) from Marajó Island, in the Brazilian Amazon region. **Parasitology Research**. 2018.

SILVA, M. C. **Microsporidiose e Coccidiose em Peixes da Espécie *Brachyplatystoma vaillantii* (VALENCIENNES, 1840) Capturados na Região Costeira do Município de Vigia de Nazaré, Estado do Pará.** 2011. 67 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense. Belém, 2011.

SINDEAUX-NETO, J. L. **Aspectos Morfológicos de Mixosporidiose em *Chaetobranchopsis orbicularis* (Steindachner 1875), (OSTEICHTHYES: CICHLIDAE) do Município de Cachoeira do Arari, Marajó, Pará.** 2013. 27 f. Especialização (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, 2013.

SINDEAUXI-NETO, J. L., VELASCO, M.; SANTOS, P.; MATOS, P.; MATOS, E. 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.; VELASCO, M.; SILVA, J. M. V.; SANTOS, P. F. S.; SANCHES, O.; MATOS, P.; MATOS, E. 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.

SITJÀ-BOBADILLA, A.; P. ALVAREZ-PELLITERO. *Zschokkella mugilis* n. sp. (Myxosporaea: Bivalvulida) from mullets (Teleostei: Mugilidae) of Mediterranean waters: Light and electron microscopic description. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, p. 755–764. 1993.

SMOTHERS, J. F.; VON DOHLEN, C. D.; SMITH, L. H.; SPALL, R. D. Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. **Science**, v. 265, n. 5179, p. 1719-1721. 1994.

SOUSA, D. G.; MENDES, N. C. B.; PEREIRA, L. J. G.; FERNANDES, S. C. P.; BENTES, B. S. Estrutura populacional e reprodução do Anujá, *Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus, 1766), em uma área de uso sustentável da Zona Costeira Amazônica. **Biota Amazônia**, v. 6, n. 2, p. 41-49. 2016.

SOUZA, L. S. B.; ROSSETTI, S. F. Análise morfoestrutural na porção leste da Ilha do Marajó/PA. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 14. 2009, Natal, **Anais...** São José dos Campos: INPE, 2009. 3387–3394p.

SPRAGUE V.; BECNEL J. J. Note on the Name-Author- Date combination for the taxon Microsporidies Balbiani, 1882, when ranked as a Phylum. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 71, p. 91-94. 1998.

SPRAGUE, V.; BECNEL, J. J.; HAZARD, E. I. Taxonomy of Phylum Microspora. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 18, p. 285-395. 1992.

STENTIFORD, G. D.; FEIST, S. W.; STONE, D. M. BATEMAN, K. S.; DUNN, A. M. Microsporidia: diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems. **Trends Parasitol.** V. 29, p. 567-578. 2013.

TAJDARI, J.; MATOS, E.; MENDONÇA, I.; AZEVEDO, C. 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, p. 377–384. 2005.

TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. L. A. P.; GUIDELLI, G. M.; PAVANELLI, G. C. Parasitos de peixes de águas continentais. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. DE L. A. P. **Sanidade de Organismos Aquáticos**, São Paulo: Livraria Varela, 2004. 179-197p.

TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C.; LIZAMA, M. A. P.; LACERDA, A. C. F.; YAMADA, F. H.; CESCHINI, T. L.; BELLAY, S. Diversity of parasites of fish the upper Paraná River floodplain, Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 691-705, 2009.

THABET, A.; TLIG-ZOUARI, S.; OMAR S. Y. A.; MANSOUR, L. Molecular and morphological characterisation of two species of the genus *Ellipsomyxa* Køie, 2003 (Ceratomyxidae) from the gall-bladder of *Liza saliens* (Risso) off Tunisian coasts of the Mediterranean. **Systematic Parasitology**, v. 93, p. 601–611. 2016.

THATCHER, V. E. Amazon fish parasites. **Amazoniana**, v. 3, n.4, p. 263-572, 1991.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L.; KRONKA, R. N. Fauna parasitária de peixes oriundos de pesque-pague do município de Franca, São Paulo, Brasil. II Metazoários. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, p. 81-95. 2001.

TOPS, S.; CURRY, A.; OKAMURA, B. Diversity and systematics of the Malacosporea (Myxozoa). **Invertebrate Biology**, v. 124, n. 4, p. 285-295. 2005.

VÁVRA, J.; LARSSON, J. I. R. Structure of the Microsporidia. In: WITTNER, M.; WEISS, L. M. Washington, D. C. **The Microsporidia and microsporidiosis**. ASM Press, 1999. 7-84p.

VÁVRA, J.; LUKEŠ, J. Microsporidia and “the art of living together”. **Advances in Parasitology**, v. 82, p. 253–319. 2013.

VAZ, Â. F. C. **Parasitoses Provocadas por *Kudoa* (Myxosporea) e Larvas de Anisakidae em *Trachurus trachurus* em Portugal**. 2000. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Universidade do Porto. Portugal, 2000.

VELASCO, M., MATOS, P.; SANCHES, O.; CLEMENTE, S. C. S.; VIDEIRA, M.; SANTOS, P. et al. Necrotizing myositis associated with parasitism by *Myxobolus* sp. (Myxozoa) in the palate of the violet goby, *Gobioides broussonnetii* (Gobiidae), from Marajó Island, Brazil. **Aquaculture**, v. 358-359, p. 129-131. 2012.

VIDEIRA, M. N. **Estudo Morfológico de Microparasitas em *Aequidens plagiozonatus* Kullander, 1984 (Osteiththyes:Cichlidae)**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Universidade Federal do Pará. 2010.

VIDEIRA, M.; CASAL, G.; ROCHA, S.; GONÇALVES, E.; AZEVEDO, C.; VELASCO, M.; MATOS, E. *Potasporea aequidens* n. sp. (Microsporidia, Tetramicridae), a parasite infecting the freshwater fish *Aequidens plagiozonatus* (Teleostei, Cichlidae) from Brazil. **Parasitology Research**, v. 114, p. 2435–2442. 2015.

VIEIRA, D. H. M. D. **Aplicação das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e histologia, para análise de mixozoários parasitos de peixes provenientes do rio Batalha, médio rio Tietê, São Paulo, Brasil**. 2016. 26 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2016.

VITA, P.; CORRAH, L.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. 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, p. 55-60. 2003.

VOSSBRINCK, C. R.; DEBRUNNER-VOSSBRINCK, B. A. Molecular phylogeny of the Microsporidia: Ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. **Folia Parasitologica**, v. 52, p. 131–142. 2005.

WEIDNER E. Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 40, p. 227–242. 1972.

WHIPPS, C. M.; ADLARD, R. D.; BRYANT, M. S.; LESTER, R. J.; FINDLAY, V.; KENT, M. L. First Report of Three *Kudoa* species from Eastern Australia: *Kudoa thyrsites* from Mahi mahi (*Coryphaena hippurus*), *Kudoa amamiensis* and *Kudoa minithyrsites* n. sp. from Sweeper (*Pempheris ypsilychnus*). **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 215-219. 2003.

WHIPPS, C. M.; FONT, W. F. Interaction of two myxozoan parasites from naked goby *Gobiosoma bosc*, in Lake Pontchartrain, Louisiana. **Journal of Parasitology**, v. 99, p. 441–447. 2013.

WOO, P. T. K. **Fish Diseases and Disorders. Protozoan and Metazoan Infections**. 2^a Edition. UK: CAB International, v. 1, 2006. 791p.

WOO, P. T. K. **Fish Diseases and Disorders**. Viral, Bacterial and Fungal Infections. UK: CAB International, v. 3, 2003. 874p.

ZACARDI, D. M. Aspectos sociais e técnicos da atividade pesqueira realizada no Rio Tracajatuba, Amapá, Brasil. **Acta of Fisheries and Aquatic Resource**, v. 3, n. 2, p. 31-48. 2015.

ZATTI, S. A.; ATKINSON, S. D.; MAIA, A. A. M.; CORRÊA, L. L.; BARTHOLOMEW, J. L.; ADRIANO, E. A. 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. 2018.

ZHAO, Y.; SUN, C.; KENT, M. L.; DENG, J.; WHIPPS, C. M. Description of a new species of *Myxobolus* (Myxozoa: Myxobolidae) based on morphological and molecular data. **Journal Parasitology**, v.49, n.3, p.737-742. 2008.

ZRNCIC, S.; ORAIC, D.; SOSTARIC, B.; CALETA, M.; BULJ, I.; ZANELLA, D.; SURMANOVIC, D. Occurrence of parasites in Cobitidae from Croatian rivers draining into two different watersheds. **Journal Appl Ichthyology**, v. 25, n. 4, p. 447-450. 2009.

ANEXO

ANEXO 01 – 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 Silvia Sárdinha Ribeiro
Coordenadora CEUA/UFRA

ANEXO 02 - Ficha para coleta de material laboratorial



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

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

ANÁLISE DA PRESENÇA DE PARASITAS:

OBSERVAÇÕES:

ANEXO 03 - Ficha de processamento - 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

FORMOL AQ 10%/DAVIDSON/AFA/OUTRO HS
 LAVAGEM EM ÁGUA CORRENTE HS
 DUPLA FIXAÇÃO HS

DESIDRATAÇÃO

ESPECIAL

ALC 70.....30' 30'1H1H
 ALC 80.....30' 30'1H1H
 ALC 90.....30' (*) 30'1H1H
 ALC ABS I.....30' 60'1H1H
 ALC ABS II.....30' 60'1H1H
 ALC ABS III.....30' 30'1H1H
 ALC XILOL 30'1H1H

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 04 - Ficha de processamento - Microscopia Eletrônica de Transmissão e de Varredura



PREPARAÇÃO DE MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA

MATERIAL..... N°...../..... DATA:...../...../.....

() **NORMAL**

() **MICROPARASITAS**

OBS: ANTES DE INICIAR A CPLHEITA 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 (*)
ÓSMIO(T) 1/1,5/2/2.5% 4°C....1/2 HS

DESIDRATAÇÃO

MICOPARASITAS

ALC 5030'	30'1H1H
ALC 7030'	30'1H1H
ALC 7530'	30'1H1H
ALC 8030'	30'1H1H
ALC 9030'	60'1H1H
ALC 9530'	60'1H1H
ALC ABS I30'	60'1H1H
ALC ABS II30'	60'1H1H
ALC ABS III30'	30'1H1H
OX PRO I15'	15'1H1H
OX PRO II15'	15'1H1H
OX PRO III30'	15'1H1H

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 01 - Artigo submetido e formatado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.



New occurrence of *Kudoa orbicularis* parasitizing the freshwater catfish *Trachelyopterus galeatus* (Teleostei: Auchenipteridae) in the Amazon region

Journal:	<i>Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária</i>
Manuscript Type:	Full Article
Status	Submitted
Impact Factor	1,090 – B1: ZOOTECNIA / RECURSOS PESQUEIROS
INSS Electronic	1984-2961

New occurrence of *Kudoa orbicularis* parasitizing the freshwater catfish *Trachelyopterus galeatus* (Teleostei: Auchenipteridae) in the Amazon region

Nova ocorrência de *Kudoa orbicularis* parasitando peixe de água doce *Trachelyopterus galeatus* (Teleostei: Auchenipteridae) na região Amazônica

Abstract

A sample of 80 specimens of the freshwater catfish, *Trachelyopterus galeatus* (Siluriformes), were collected in the municipality of Cachoeira do Arari, on Marajó Island, in Pará, Brazil. Pseudocysts were found in the muscle fibres of the epaxial and hypaxial regions of 85% of the specimens analysed, reflecting a high infection rate. The pseudocysts contained spores that were pseudo-square in shape, with a mean length of 4.65 (4.04–5.54) μm and mean width of 1.53 (1.56–1.74) μm . The analyses of the morphology of the spore and a partial 934-bp sequence of the SSU rDNA gene confirmed that the micro parasite was *Kudoa orbicularis*. This is the first record of this microparasite in a siluriform host from the Brazilian Amazon region.

Keywords: Amazon Region; Anujá catfish; Myxozoa; *Kudoa orbicularis*; Microparasite

Resumo

Foram analisados 80 exemplares de *Trachelyopterus galeatus* capturados no Município de Cachoeira do Arari, ilha de Marajó-PA, Brasil. A presença de pseudocistos nas fibras musculares das regiões epiaxial e hipoaxial em 85% dos exemplares analisados, mostra alto grau de infecção. Os pseudocistos continham esporos de formato pseudoquadrado, medindo 4.65 (4.04-5.54) μm de comprimento e 1.53 (1.56-1.74) μm de largura, com quatro cápsulas polares de tamanho iguais medindo 2.22 (2.05-2.32) μm de comprimento e 1.53 (1.56-1.74) μm de largura. Através das análises morfológicas dos esporos e molecular de uma sequência parcial de 934bps do gene SSU rDNA, confirma que o microparasito é *Kudoa orbicularis*, sendo este o primeiro registro desse microparasito em hospedeiro da ordem Siluriformes da Amazônia brasileira.

Palavras-chave: Região Amazônica; Anujá; Myxozoa; *Kudoa orbicularis*; Microparasito

Introduction

The fisheries of the Amazon region of Brazil are distinct from the other regions of the country, in terms of the diversity of species harvested, the volume of the catches, and the dependence of the local populations on this economic activity (BARTHEM & FABRÉ, 2004). One of the target species in the Amazon basin is the Anujá catfish, *Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus, 1766), which is found in swamps and under rafts of floating vegetation. This economically valuable siluriform species, also known as the cangati or cachorrinho de padre, is an omnivorous fish found throughout South America, where it is an important source of food and income for many riverside communities (BORGES et al., 1999; COSTA-NETO, 2000; SANTOS et al., 2004; FERRARIS-JR, 2007; SANTIM et al., 2015; SOUSA et al., 2016).

Trachelyopterus galeatus may be a host of an enormous diversity of pathogens. Parasites are relatively common in freshwater fish, and many cause tissue lesions, which may not only be fatal to the fish, but may reduce the quality and value of the fishery product, as well as being a potential risk to human health (FERRE, 2001; EIRAS et al., 2004; WOO, 2006). The microscopic cnidarians of the subphylum Myxozoa are an important group of parasites of aquatic organisms, which infect marine and freshwater vertebrates and invertebrates, and include a majority of the micro-organisms that cause disease in fish (KENT et al., 2001; LOM & DYKOVÁ, 2006).

The myxozoans of the genus *Kudoa* are typically star-shaped, square, pseudo-square or rounded in the apical view, with four or more valves and polar capsules, which are found primarily in the muscle tissue of the host, and can cause post-mortem myoliquefaction. These parasites may also infect other types of tissue, such as the brain, integument, kidney, fins, peritoneum, and mesentery (MORAN et al. 1999, SWEARER & ROBERTSON, 1999; WHIPPS et al., 2004; LOM & DYKOVÁ, 2006; CASAL, 2009; KRISTMUNDSSON & FREEMAN, 2014).

The morphological and morphometric analyses traditionally used to identify most myxozoan species may not be sufficient to confirm all taxa reliably, which highlights the need for complementary techniques, in particular, molecular biology, which has been widely used to determine species of fish parasites (CLARK, 2006; MENEZES et al., 2010). The present study confirms the infection of the Anujá catfish, *T. galeatus*, from the Marajó Archipelago in northern Brazil by *Kudoa orbicularis*. This parasite was found infecting the musculature of the fish, and was identified by a combination of morphological and molecular analyses.

Materials and Methods

A total of 80 *Trachelyopterus galeatus* specimens were collected in the region of Cachoeira do Arari, in the Marajó Archipelago, Pará, northern Brazil (01°00' S, 48°57' W) between January 2016 and December 2017. These specimens had a mean total length of 13.00 ± 2.01 cm (10.5–16.5 cm) and mean weight of 50.24 ± 15.64 g (27.97–80.3 g). After being captured, the specimens were transported alive in aerated water from the natural habitat to the Carlos Azevedo Research Laboratory (LPCA) at the Federal Rural University of Amazonia (UFRA) in Belém (Pará).

In the laboratory, the specimens were maintained in aquaria with water at a temperature of 28–30°C, and prior to necropsy, they were anaesthetised using tricaine methanesulfonate (MS-222) diluted in water at a concentration of 50mg/L. Specimen collection was authorised by the Brazilian Institute for the Environment and Renewable Natural Resources, IBAMA (SISBIO, licence number 27119-1) and the UFRA Committee for the Ethical Use of Animals in Research (CEUA: 013/2014).

Following euthanasia, the specimens were first examined under a stereomicroscope to verify the presence of cysts, which were then observed by light microscopy. Once the parasitism was confirmed, small (0.5 cm) samples of muscle tissue were obtained from infected epaxial and hypaxial tissue for light microscopy and processing for molecular analyses.

For light microscopy, the parasitised samples were fixed in Davidson solution (95% ethanol, formaldehyde, acetic acid, and distilled water) for 24 hours, embedded in paraffin, and stained with Hematoxylin-Eosin (HE) and Ziehl-Neelsen (LUNA, 1968). The stained slides and fresh spores were photographed using a ZEISS Primo Star microscope with an attached ZEISS AxioCamERc 5s camera, and AxioVision 5.1 software. Some tissue samples containing cysts were analysed by Differential Interference Contrast (DIC) using a ZEISS AxioScope.A1 microscope with ZEISS AxioCam 512 color camera. The fresh spores were measured in micrometres (μm), and the measurements are presented as means with minimum and maximum values between parentheses (LOM & DYKOVÁ, 1992). The prevalence of infection was determined as in Bush et al. (1997).

For the molecular analysis, the myxozoan spores were collected and fixed in 80% ethanol. The DNA of the spores was extracted using the PureLink® Genomic DNA mini kit (Invitrogen, USA), following the protocol for the extraction of “Mammalian Tissue and Mouse/Rat Tail Lysate” provided by the manufacturer. The DNA samples were quantified in

a Biodrop Duo spectrophotometer (Biodrop). Polymerase Chain Reactions (PCRs) were run to obtain the Small Subunit Ribosomal DNA (SSU rDNA), initially with the universal Eukaryotic forward primer 18E (HILLIS & DIXON, 1991) and the reverse primer 18R (WHIPPS et al., 2003b). The PCR was run in a final volume of 25 μ l, containing 1 x ReddyMix PCR Master mix (Thermo Scientific, USA), 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM of KCl, 0.1 (V/V) of Nonidet P40, 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each nucleotide triphosphate (Thermo Scientific, USA), 10 pmol of each primer, 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Thermo Scientific, USA), and the DNA template (10-50 ng/ μ l). The reaction protocol for the primers 18E and 18R consisted of 95°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of 95°C for 60 seconds, 48°C (annealing temperature) for 60 seconds, and 72°C for 120 seconds, with a final extension of 72°C for 10 min. Subsequently, 3 μ l of the PCR mix was electrophoresed in 1% agarose gel with 1X Tris-Borate-EDTA (TBE), stained with SYBR® Safe (Invitrogen, USA) and visualised under blue light. The PCR products were purified with GFX™ PCR DNA and a Gel Band Purification kit (GE Healthcare, UK), according to the manufacturer's instructions. The sequencing reactions were conducted with the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA), following the manufacturer's instructions, in an ABI 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA).

The sequences obtained by this procedure were aligned in the BioEdit software (HALL, 1999) and ambiguous bases were clarified using the respective chromatograms. The sequences of the SSU rDNA gene of the myxozoan species deposited in the GenBank were aligned in Clustal X 1.8 (THOMPSON et al., 1997), at the default setting, to determine their phylogenetic relationships with the new species described here. High similarity scores in the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) were used as the criterion to select the GenBank sequences for inclusion in the analysis. The jModelTest 0.1.1 software (GUINDON & GASCUEL, 2003; POSADA, 2008) was used to identify the optimal nucleotide substitution model for the dataset. Bayesian Inference was implemented in MrBayes, version 3.1.2 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003) using Markov Chain Monte Carlo searches of two simultaneous runs of four chains of 5,000,000 generations, with every 500th tree being sampled. The first thousand trees were discarded as burn-in, and the posterior probability of each node were calculated from the remaining trees, examined initially in TreeView X (PAGE, 1996). Genetic distances were computed in PAUP* 4.0b1 (SWOFFORD, 2003) using the default *p* parameter for the SSU rDNA gene.

Results

Morphological description

Light microscopy revealed the presence of pseudocysts in the skeletal muscle fibres of the epaxial and hypaxial regions of the host specimens analysed (Figure 1a). The pseudocysts, formed by agglomerations of *Kudoa* spores, were pseudo-square in shape with rounded edges in the apical view, and four piriform polar capsules of equal size (Figures 1b and 1c), although it was not possible to confirm the number of coils in the polar filament. The spores were 4.65 (4.04–5.54) μm in length and 5.25 (4.78–5.98) μm in width, with polar capsules 2.22 (2.05–2.32) μm long and 1.53 (1.56–1.74) μm wide (Table 1). Overall, 68 (85%) of the 80 *T. galeatus* specimens examined were infected by *Kudoa* sp.

Histology

The histological analysis indicated that the pseudocysts develop in the intracellular region of the muscle fibres, substituting the sarcoplasm of the fibre segments completely with *Kudoa* spores, causing the deformation of these structures, as well as some adjacent muscle fibres (Figures 2b and 2c). The spores were enveloped in a fine layer of sarcolemma (Figure 2c). The pseudocysts were located in the cytoplasm of the host fibres (Figure 2a), although no inflammatory response to the infection was observed in the host, nor were any clinical symptoms, including myoliquefaction, confirmed.

Taxonomic Summary

Phylum Cnidaria Hatschek, 1888

Class Myxosporea Bütschli, 1881

Order Multivalvulida Shulman, 1959

Family Kudoidae Meglitsch, 1960

Genus *Kudoa* Meglitsch, 1947

Species: *Kudoa orbicularis* Azevedo et al., 2016

Type host: *Trachelyopterus galeatus* Linnaeus, 1766

Infection site: Striated skeletal musculature.

Type locality: Brazil, state of Pará, municipality of Cachoeira do Arari, Marajó Island (01°00' S, 48°57' W).

Prevalence: 85% (68/80) of the hosts examined were infected.

Phylogenetic analysis

A partial, 934 base-pair sequence of the SSU rDNA gene was obtained from the *K. orbicularis* spores found in the musculature of *T. galeatus*. This sequence was deposited in GenBank under access number MK204656. Two clades, denominated A and B, were identified in the phylogenetic analysis (Figure 2). Clade A was divided into two subclades formed exclusively by marine *Kudoa* species, with the exception of *K. orbicularis* (AZEVEDO et al., 2016), which clustered together with the other *Kudoa* species analysed, with high nodal (posterior probability) support. The *Kudoa* species of clade A are found almost exclusively in the muscle tissue of their hosts, which are predominantly fishes of the order Perciformes, with tissue tropism in the musculature. However, some *Kudoa* species parasitise other types of tissue, such as the organs of the digestive system (oesophagus and intestine), which is parasitised by *K. dianae* (AF414692) and *K. cookii* (JX090294), and the Central Nervous System (neurones and brain), which is infected by *K. neurophila* (AY172511), *K. chaetodoni* (DQ519387), *K. prunusi* (AB573715), *K. lemniscati* (JQ026222), and *K. lethrini* (DQ519388). The *Kudoa* species that infect the digestive system were allocated to subclade A1 in the present analysis, together with the *Kudoa* species that infect the muscle tissue of host species belonging to a variety of fish orders. The *Kudoa* species that parasitise the nervous system present tropism characteristic of this type of tissue, and cluster in subclade A2, together with *K. igami* (AB844444) and *K. thalassomi* (AB844443), which infect the musculature. All the species in this subclade parasitise fish of the Perciformes, and thus appear to be specialised in hosts of this order.

Clade B is formed by species of the genus *Unicapsula* Davis, 1924, a member of the order Multivalvulida Shulman, 1959. Most of these species infect the skeletal musculature of their hosts, except for *Unicapsula fatimae* (KT894108), which is a parasite of the oesophagus. Once again, however, all the host species of this clade are fish of the order Perciformes (Figure 3).

The sequences were realigned for the pairwise comparison of a subset of the *Kudoa* species that parasitise the musculature of their hosts. The minimum p distance recorded in the present study (Table 2) was 3.68% between the *K. orbicularis* analysed here and *K. orbicularis* (KM192365). All other distances were over 5.0%, reaching a maximum of 6.68%, in the case of *K. whippsi*.

Discussion

Kudoa orbicularis was described from the musculature of specimens of the cichlid, *Chaetobranchopsis orbicularis* (Perciformes), collected from the Arari River, on Marajó Island (AZEVEDO et al., 2016), the same locality from which the *T. galeatus* specimens analysed in the present study were collected. The morphological features of the *K. orbicularis* spores and polar capsules found in *T. galeatus* were closely similar to those described by Azevedo et al. (2015) and Sindeaux-Neto et al. (2017) in the *K. orbicularis* specimens obtained from the host fish, *C. orbicularis*. Despite being the same species, minor morphological differences are typically found in the size of myxozoan spores in different hosts (KOVALEVA et al., 1979; YANAGIDA et al., 2004). The *K. orbicularis* spores are much smaller than those of *Kudoa islandica*, *Kudoa inornata* and *Kudoa ogawai*, although the polar capsules are larger than those of *K. islandica* (Table 1).

The spores of *Kudoa quadricornis*, infecting *Carangoides fulvoguttatus* (WHIPPS et al., 2003b), and *Kudoa rninithyrsites* in *Pempheris ypsilychnus* (WHIPPS et al., 2003a), were observed developing intracellularly in the microfibrils of the host, as observed in the present study. The histology of *K. orbicularis* in the present study was similar to that of *K. inornata* observed in the skeletal musculature of *Cynoscion nebulosus* by Dyková et al. (2009), who also described a fine layer of sarcolemma enveloping the mature spores within the fibres. A similar configuration was described by Dyková et al. (2002) in the case of *Kudoa diana* infecting the oesophageal musculature of *Sphoeroides annulatus*, and in *Kudoa igami* in the muscle tissue of *Calotomus japonicus* (SHIRAKASH et al., 2014). In both cases, no evidence of inflammation or any other response to the presence of the parasite was observed in the host. However, Azevedo et al. (2016) and Sindeaux-Neto et al. (2017) did observe inflammation in the muscle tissue infected by *K. orbicularis*, as well as lethargic behaviour in the host fish, including irregular tail movements, and immobility, although these patterns were not observed in *T. galeatus* in the present study.

The similarities in the morphological characteristics of the *K. orbicularis* specimens observed in the present study in comparison with the original description of this species (AZEVEDO et al., 2016), together with the muscle tissue tropism, the freshwater habit of the host, and the geographic location of the two cases, all confirm the species identification. In addition to the identification of *Kudoa* species based on morphological and morphometric parameters, a number of recent descriptions have also included molecular comparisons, which

not only provide a more reliable diagnosis, but also the analysis of phylogenetic patterns (EIRAS et al., 2014).

The phylogenetic tree derived from the molecular analyses applied in the present study (Figure 3) also confirmed the proximity of the *K. orbicularis* specimens found in *T. galeatus* with the *K. orbicularis* sequence described by Azevedo et al. (2016), with maximum (100%) branch support. In addition to this significant genetic similarity, this is the only *Kudoa* species of clade A known to parasitise a freshwater host, in contrast with all the other *Kudoa* species included in this clade, which infect marine hosts. Hervio et al. (1997) observed that *Kudoa* species tend to group by geographic location, rather than the morphological similarity of the spores, as confirmed in the present study.

In the other subclades, some *Kudoa* species were grouped by host specificity, tissue tropism and/or geographic region. The second cluster of subclade A1, for example, groups 11 *Kudoa* species that parasitise the muscle tissue of perciforms, but from distinct localities, while the third cluster is formed by two species (*K. quadricornis* and *K. paraquadricornis*) that parasitise the muscle of perciforms, in this case, from the same locality, Heron Island in Australia. The first of these clusters had 76% branch support, and the second cluster, 100% support.

The findings of the present study thus support the hypothesis that the tissue tropism found in some *Kudoa* species has a genetic component, although there are also significant deviations (BURGER et al., 2007). In the fourth cluster, for example, which includes the *Kudoa* species not grouped by any of these factors, the parasites infect different types of tissue, and are found in a broad diversity of fish orders and geographic localities, with branch support of only 65%. However, these species do have the marine habitat of their hosts in common. Subclade A2, which has a branch support of 74%, includes *Kudoa* species that infect different types of tissue, but is supported by the specificity of its hosts, with all the parasites being found in perciform fish.

The present study confirmed that *K. orbicularis* may infect fish hosts belonging to different orders, which indicates that this microparasite is not host-specific, and while many *Kudoa* species are host-specific, a number of species are known to infect different types of host. These species include *Kudoa hypoepicardialis*, which has been found infecting seven different host species belonging to seven different genera and families (BLAYLOCK, et al., 2004), while *Kudoa thyrsites* is known to infect fish of different families, and is thought to have a cosmopolitan distribution (WHIPPS & KENT, 2006; JONES et al., 2016).

The relationships among *Kudoa* species, based on their morphology, tissue tropism, habitat (freshwater vs. saltwater), and geographic region, and the results of the phylogenetic analysis support conclusively the conclusion that *T. galeatus* was infected by *K. orbicularis*, a species described previously in *C. orbicularis* (AZEVEDO et al., 2016). This is the first record of the occurrence of a *Kudoa* parasite in a catfish (Siluriformes) host in the Brazilian Amazon region.

References

Azevedo C, Rocha S, Matos E, Oliveira E, Matos P, Al-Quraishy S, Casal G. Ultrastructural and Phylogenetic Description of *Kudoa orbicularis* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida): A Parasite Infecting the Muscle of the Fish *Chaetobranchopsis orbicularis* (Teleostei: Cichlidae) in the Amazon Region. *J Eukaryot Microbiol* 2016. 63: 27-36. <https://doi.org/10.1111/jeu.12244>

Barthem RB, Fabr e NN. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiro da Amazônia. In: Rufino ML, *A pesca e os recursos pesqueiros da Amazônia*. Manaus: Ibama/ProV rzea; 2004. p. 11-55.

Blaylock RB, Bullard SA, Whipps CM. *Kudoa hypoepicardialis* n. sp. (Myxozoa: Kudoidae) and associated lesions from the heart of seven perciform fishes in the northern Gulf of Mexico. *J Parasitol* 2004; 90(3): 584–593. <https://doi.org/10.1645/GE-161R>

Borges SAGV, Gurgel HCB, Canan B. Estrutura populacional de *Parauchenipterus galeatus* Linnaeus, 1766 (Siluriformes, Auchenipteridae), da Lagoa de Jiqui, Parnamirim, Rio Grande do Norte. *Revista Ceres* 1999; 46 (264): 209-218.

Burger MAA, Cribb TH, Adlard RD. Patterns of relatedness in the Kudoidae with descriptions of *Kudoa chaetodoni* n. sp. and *K. lethrini* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida). *Parasitology* 2007; 134: 669–681. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001995>

Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol* 1997; 83(4): 575-583. <https://doi.org/10.2307/3284227>

Casal, G. *Microsporidioses e Myxosporidioses da ictiofauna portuguesa e brasileira: caracterização ultrastrutural e filogenética* [Tese]. Portugal: Universidade do Porto, 2009.

Casal G, Matos E, Matos P, Azevedo C. Ultrastructural description of a new myxosporean parasite *Kuoda aequidens* sp. n. (Myxozoa, Myxosporidia) found in the sub-opercular musculature of *Aequidens plagiozonatus* (Teleostei) from the Amazon liver. *Acta Protozool* 2008; 47: 135–141.

Clark TG. Molecular approaches and techniques. In: Woo PTK. (Ed.), *Fish diseases and disorders: protozoan and metazoan infections*. 2^a ed. Vol. 1. Oxfordshire, UK: Cab International; 2006. p. 725-752.

Costa-Neto EM. Conhecimento e usos tradicionais de animais por uma comunidade afro-brasileira do Parque Nacional Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. Resultados preliminares. *Interciencia* 2000; 25(9): 423-431.

Dyková I, Avila EJF, Fiala I. *Kuoda diana* sp. n. (Myxosporidia: Multivalvulida), a new parasite of bullseye puffer, *Sphoeroides annulatus* (Tetraodontiformes: Tetraodontidae). *Folia Parasitol* 2002; 49: 17–23. <https://doi.org/10.14411/fp.2002.006>

Dyková I, Buron I, Fiala I, Roumillat WR. *Kuoda inornata* sp. n. (Myxosporidia: Multivalvulida) from the skeletal muscles of *Cynoscion nebulosus* (Teleostei: Sciaenidae). *Folia Parasitol* 2009; 56(2): 91–98. <https://doi.org/10.14411/fp.2009.014>

Eiras JC, Pavanelli GC, Takemoto RM. *Henneguya paranaensis* sp. n. (Myxozoa, Myxobolidae), a parasite of the teleost fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the Paraná river, Brazil. *Bull. Eur Ass Fish Pathol* 2004; 24(6): 308-311.

Eiras JC, Saraiva A, Cruz C. Synopsis of the species of *Kuoda* Meglitsch, 1947 (Myxozoa: Myxosporidia: Multivalvulida). *Syst Parasitol* 2014; 87: 153–180. <https://doi.org/10.1007/s11230-013-9461-4>

Ferraris-Jr CJ. Auchenipteridae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris-Jr CJ. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs; 2003. p. 470-482.

Ferre I. Anisakiosis y otras zoonosis parasitarias transmitidas por consume de pescado. *Aquatic* 2001; 14: 1-21.

Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003; 52(5): 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41: 95–98.

Hervio DML, Kent ML, Khattra J, Sakanari J, Yokoyama H. Taxonomy of *Kudoa* species (Myxosporea), using a small-subunit ribosomal DNA sequence. *Can J Zool* 1997; 75: 2112-2119. <https://doi.org/10.1139/z97-846>

Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quart Rev of Biol* 1991; 66(4): 411-446. <https://doi.org/10.1086/417338>

Jones SEM, Cho S, Nguyen J, Mahony A. Acquired resistance to *Kudoa thyrsites* in Atlantic salmon *Salmo salar* following recovery from a primary infection with the parasite. *Aquaculture* 2016; 451: 457–462. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.002>

Kasai A, Li Y-C, Mafie E, Sato H. Morphological and molecular genetic characterization of two *Kudoa* spp., *K. musculoliquefaciens*, and *K. pleurogrammi* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida), causing myoliquefaction of commercial marine fish. *Parasitol Res* 2016; 115(5): 1883–1892. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4928-2>

Kent ML, Andree KB, Bartholomew JL, El-Matbouli M, Desser SS, Devlin RH, Feist SW, Hedrick RP, Hoffmann RW, Khattra J, Hallett SL, Lester RJG, Longshaw M, Palenzeula O, Siddall ME, Xiao C. Recent Advances in Our Knowledge of the Myxozoa. *J Eukaryot Microbiol* 2001; 48(4): 395-414. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00173.x>

Kovaleva AA, Shulman SS, Yakovlev VN. Myxosporidia of the genus *Kudoa* (Myxosporidia, Multivalvulida) from the basin of the Atlantic Ocean. In: Systematics and ecology of sporozoans and cnidosporidians. *Tr Zool Inst* 1979; 87: 42–64.

Kristmundsson Á, Freeman MA. Negative effects of *Kudoa islandica* n. sp. (Myxosporidia: Kudoidae) on aquaculture and wild fisheries in Iceland. *Inter J Parasitol* 2014; 3: 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.06.001>

Lom J, Dyková I. *Development in aquaculture and fisheries science: Protozoan Parasites of Fishes*. Vol. 26. Amsterdam: Elsevier; 1992. p. 315.

Lom J, Dyková I. Myxozoan genera: Definition and notes on taxonomy, lifecycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol* 2006; 53: 1-36. <https://doi.org/10.14411/fp.2006.001>

Luna LG. *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*. 3^a Ed. New York: McGraw-Hill; 1968. p. 25.

Menezes PJ, Lupatini M, Antonioli ZI, Blume E, Junges E, Manzoni CG. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemis*. *Ciênc Agrotec* 2010; 34(1): 132-139. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000100017>

Moran JDW, Whitaker DJ, Kent MLA. Review of the myxosporean genus *Kudoa* Meglitsch, 1947, and its impact on the international aquaculture industry and commercial fisheries. *Aquaculture* 1999; 172: 163-196. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00437-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00437-2)

Page RDM. Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 1996; 12(4): 357–358. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/12.4.357>

Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 2008; 25(7): 1253–1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>

Ronquist F, Huelsenbeck J.P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 2003; 19 (12): 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>

Santim M, Lopes TM, Baggio MM, Agostinho AA, Bialetzki A. Mudanças Ontogênicas no Trato Digestório e na Dieta de *Trachelyopterus galeatus*. *Bol Inst Pesca* 2015; 41(1): 57 – 68.

Santos GM, Merona B, Juras AA, Jégu M. *Peixes do Baixo Rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí*. Brasília, DF: Eletronorte, 2004. p. 216.

Shirakashi S, Yamane K, Ishitani H, Yanagida T, Yokoyama H. First report of *Kudoa* species in the somatic muscle of the Japanese parrotfish *Calotomus japonicus* (Scaridae) and a description of *Kudoa igami* n. sp. (Myxozoa: Multivalulida). *Parasitol Res* 2014; 113: 2515–2524. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3901-1>

Sindeaux-Neto JL, Velasco M, Santos P, Matos P, Matos E. Infecção por *Kudoa orbicularis* (Myxozoa: Multivalvulidae) na musculatura de *Chaetobranchopsis orbicularis* Steindachner, 1875, oriundo da Ilha de Marajó na região Amazônica do Brasil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2017; 69(6): 1601-1606. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8989>

Sousa DG, Mendes NCB, Pereira LJG, Fernandes SCP, Bentes BS. Estrutura populacional e reprodução do Anujá, *Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus, 1766), em uma área de uso sustentável da Zona Costeira Amazônica. *Biot Amazon* 2016; 6(2): 41-49. <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v6n2p41-49>

Swearer SE, Robertson DR. Life history, pathology, and description of *Kudoa ovivora* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea): an ovarian parasite of caribbean labroid fishes. *J Parasitol* 1999; 85(2): 337–353. <http://dx.doi.org/10.2307/3285645>

Swofford DL. PAUP*. *Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*, v. 4.0 beta 10. Sunderland: Sinauer associates; 2003.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL–X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res* 1997; 25(24): 4876–4882.

Whipps CM, Adlard RD, Bryant MS, Kent ML. Two unusual myxozoans, *Kudoa quadricornis* n. sp. (Multivalvulida) from the muscle of goldspotted trevally (*Carangoides fulvoguttatus*) and *Kudoa permulticapsula* n. sp. (Multivalvulida) from the muscle of spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*) from the Great Barrier Reef, Australia. *J Parasitol* 2003a; 89(1): 168–173. [http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0168:TUMKQN\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0168:TUMKQN]2.0.CO;2)

Whipps CM, Adlard RD, Bryant MS, Lester RJG, Findlay V, Kent ML. First report of three *Kudoa* species from eastern Australia: *Kudoa thyrsites* from mahi mahi (*Coryphaena hippurus*), *Kudoa amamiensis* and *Kudoa minithyrsites* n. sp from sweeper (*Pempheris ypsilychnus*). *J Eukaryot Microbiol* 2003b; 50(3): 215–219. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00120.x>

Whipps CM, Grossell G, Adlard RD, Yokoyama H, Bryant MS, Munday BL, Kent ML. Phylogeny of the Multivalvulidae (Myxozoa: Myxosporea) based on comparative ribosomal DNA sequence analysis. *J Parasitol* 2004; 90(3): 618–622. <https://doi.org/10.1645/GE-153R>

Whipps CM, Kent ML. Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea). *J Eukaryot Microbiol* 2006; 53(5): 364–373. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00114.x>

Woo PTK. *Fish Diseases and Disorders, Protozoan and Metazoan Infections*. 2^a ed. UK: CAB International; 2006. p. 791.

Yanagida T, Nomura Y, Kimura T, Fukuda Y, Yokoyama H, Ogawa K. Molecular and Morphological Redescriptions of Enteric Myxozoans, *Enteromyxum Ieei* (formerly *Myxidium* sp. TP) and *Enteromyxum fugu* comb. n. (syn. *Myxidium fugu*) from Cultured Tiger Puffer. *Fish Pathol* 2004; 39(3): 137–144. <http://dx.doi.org/10.3147/jsfp.39.137>

Yokoyama H, Yanagida T, Shirakashi S. *Kudoa ogawai* n. sp. (Myxozoa: Multivalvulida) from the trunk muscle of Pacific barrelfish *Hyperoglyphe japonica* (Teleostei: Centrolophidae) in Japan. *Parasitol Res* 2012; 110: 2247–2254. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2756-y>

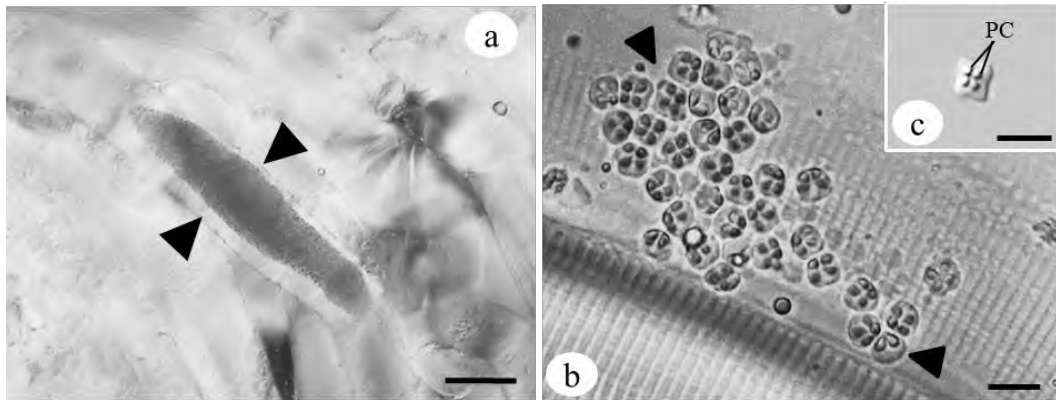


Figure 1 – Photomicrograph of *K. orbicularis* in *T. galeatus*: a) Pseudocyst (arrowhead) (DIC) in the striated skeletal muscle fibre. Scale bar: 100 μ m; b) Fresh spores (arrowhead). Scale bar: 05 μ m; c) Detail of the spore (apical view) under DIC, showing the four polar capsules (PC). Scale bar: 05 μ m;

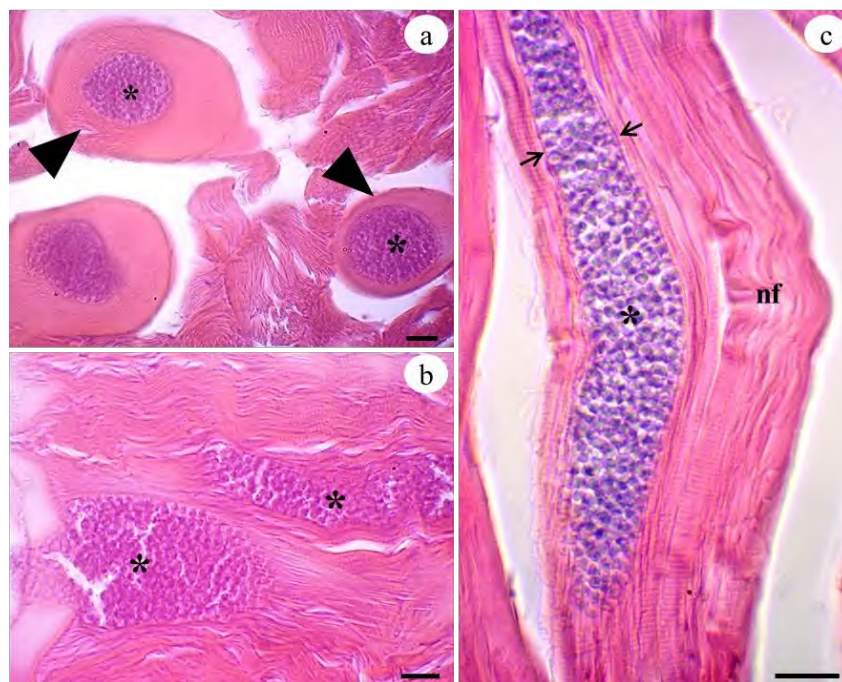


Figure 2 – Photomicrograph of *K. orbicularis* infecting *T. galeatus*: a) Pseudocysts (*) located in the cytoplasm (arrowheads) of the muscle fibres, stained with HE. Scale bar: 20 μ m; b) Histological section of the pseudocysts stained with HE (*). Scale bar: 20 μ m; c) Pseudocyst (*) deforming the neighbouring fibres (nf) and pseudocyst enveloped by a fine layer of sarcolemma (arrows), stained with ZN. Scale bar: 20 μ m.

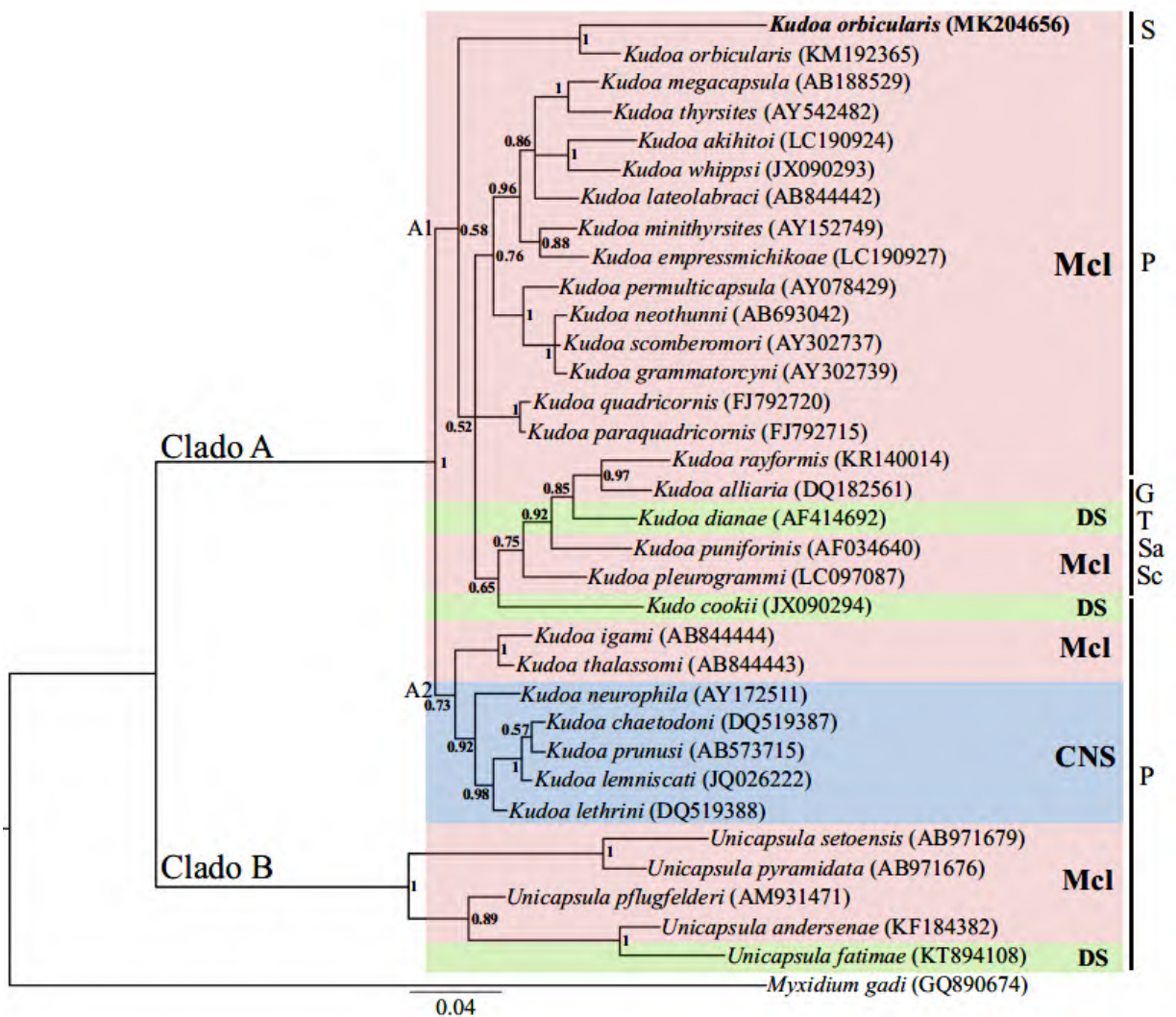


Figure 3 - Phylogenetic tree generated by Bayesian Inference (BI) of the partial sequences of the SSU rDNA gene of *K. orbicularis* retrieved from *T. galeatus* in the present study and from other, closely-related myxozoans. The GenBank access numbers are shown next to the species names. The numbers at each node are the posterior probabilities calculated by the BI. The species analysed in the present study is highlighted in bold type. Abbreviations: Mcl = musculature; DS = Digestive System; CNS = Central Nervous System; S = Siluriformes; P = Perciformes; T = Tetraodontiformes; G = Gadiformes; Sa = Salmoniformes; Sc = Scorpaeniformes.

Table 1 - Comparative descriptive measurements (means in μm , with ranges in parentheses) of *K. orbicularis* and other species that parasitise the musculature of the fish hosts.

Species	Host	Site of infection	Spore morphology	Spore length	Spore width	PC length	PC width	Locality	Reference
<i>Kudoa orbicularis</i>	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	Muscle	Pseudoquadrate	4.65 (4.04-5.54)	5.25 (4.78-5.98)	2.22 (2.05-2.32)	1.53 (1.56-1.74)	Brazil	Present study
<i>Kudoa orbicularis</i>	<i>Chaetobranchopsis orbicularis</i>	Muscle	Pseudoquadrate	4.4 - 4.8	5.0 - 5.6	1.4 - 2.0	1.2 - 1.6	Brazil	Sindeaux-Neto et al., 2017
<i>Kudoa orbicularis</i>	<i>Chaetobranchopsis orbicularis</i>	Muscle	Rounded quadrate	4.3 (3.6–5.0)	5.1 (4.2–5.8)	2.1 (1.7–2.6)	1.3 (0.9–1.7)	Brazil	Azevedo et al., 2016
<i>Kudoa pleurogrammi</i>	<i>Pleurogrammus monopterygius</i>	Muscle	Subquadrate	6.3 (5.6 – 8.8)	8.6 (8.2 - 9.1)	2.8 (2.7- 2.8)	1.6 (1.4 – 2.0)	USA	Kasai et al., 2016
<i>Kudoa inornata</i>	<i>Cynoscion nebulosus</i>	Skeletal muscles	Rounded quadrate	5.4 (5.3–5.5)	5.9 (5.8–6.0)	2.7	-	USA	Dyková et al., 2009
<i>Kudoa islandica</i>	<i>Cyclopterus lumpus</i>	Skeletal muscles	Rounded quadrate	4.8 (4.1–5.1)	7.4 (6.5–8.6)	1.7 (1.4–1.9)	1.5 (1.2–1.8)	Iceland	Kristmundsson & Freeman, 2014.
<i>Kudoa ogawai</i>	<i>Hyperoglyphe japonica</i>	muscle tissue	Pseudoquadrate	8.93 (8.3–9.6)	13.29 (12.0–14.2)	2.45 (1.9–3.2)	2.48 (1.7–3.0)	Japan	Yokoyama et al., 2012
<i>Kudoa aequidens</i>	<i>Aequidens plagiozonatus</i>	Sub-opercular Musculature	Quadrate or pseudoquadrate	3.2 (2.9–3.5)	6.8 (6.2–7.1)	2.2 (2.0–2.6)	1.2 (1.1–1.5)	Brazil	Casal et al., 2008

PC – Polar capsule

Table 2 - The pairwise p distances between the *Kudoa* species that parasitise the muscle tissue of their hosts.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8
(1) <i>K. orbicularis</i> (MK204656)	-							
(2) <i>K. orbicularis</i> (KM192365)	0.0368	-						
(3) <i>K. megacapsula</i> (AB188529)	0.0540	0.0425	-					
(4) <i>K. thyrsites</i> (AY542482)	0.0529	0.0414	0.0110	-				
(5) <i>K. akihittoi</i> (LC190924)	0.0610	0.0494	0.0244	0.0244	-			
(6) <i>K. whippsi</i> (JX090293)	0.0668	0.0575	0.0289	0.0311	0.0266	-		
(7) <i>K. lateolabraci</i> (AB844442)	0.0575	0.0469	0.0188	0.0210	0.0244	0.0221	-	
(8) <i>K. empessmichikoeae</i> (LC190927)	0.0610	0.0425	0.0199	0.0177	0.0221	0.0311	0.0188	-