



**Universidade Federal do Pará**  
**Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural**  
**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental**  
**Universidade Federal Rural da Amazônia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**LILIAN DE NAZARÉ SANTOS DIAS**

**FAUNA MICROPARASITÁRIA DE *Brachyplatystoma rousseauxii* E *Mugil curema***  
**DESEMBARCADOS NA AMAZÔNIA ORIENTAL**

**Belém-PA**  
**2013**

**LILIAN DE NAZARÉ SANTOS DIAS**

**FAUNA MICROPARASITÁRIA DE *Brachyplatystoma rousseauxii* E *Mugil curema*  
DESEMBARCADOS NA AMAZÔNIA ORIENTAL**

Tese apresentada para obtenção do grau de  
Doutor em Ciência Animal. Programa de Pós-  
Graduação em Ciência Animal. Núcleo de  
Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural.  
Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira  
de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental.  
Universidade Federal Rural da Amazônia.  
Área de concentração: Sanidade Animal  
Orientador Prof. Dr. José de Arimatéa Freitas

Co-orientadores: Prof. Dr. Edilson Matos  
Prof. Dr. Rosildo Santos Paiva

**Belém-PA  
2013**

**LILIAN DE NAZARÉ SANTOS DIAS**

**FAUNA MICROPARASITÁRIA DE *Brachyplatystoma rousseauxii* E *Mugil curema*  
DESEMBARCADOS NA AMAZÔNIA ORIENTAL**

Tese apresentada para obtenção do grau de  
Doutor em Ciência Animal. Programa de Pós-  
Graduação em Ciência Animal. Núcleo de  
Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural.  
Universidade Federal do Pará. Empresa  
Brasileira de Pesquisa Agropecuária –  
Amazônia Oriental. Universidade Federal  
Rural da Amazônia.  
Área de concentração: Sanidade Animal

Data da aprovação. Belém - PA: 29/11/2013

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. José de Arimatéa (Orientador)  
Universidade Federal Rural da Amazônia

---

Prof. Dra. Alessandra Scofield Amaral (Membro Titular)  
Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves (Membro Titular)  
Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dra. Hilma Lúcia Tavares Dias (Membro Titular)  
Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr. Raimundo Nonato Moraes Benigno  
(Membro Titular)- Universidade Federal Rural da Amazônia

## DEDICO

À Deus pela luz e inspiração em todos os momentos de minha vida.

Aos meus grandes mestres José de Arimatéa e Edilson Matos.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Pará.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Ao meu orientador Prof. Dr. José de Arimatéa Freitas pela de orientação, paciência, confiança, dedicação e amizade que foram fundamentais na minha formação profissional e pelo exemplo de docente.

Ao Prof. Dr. Edilson Matos pelo conhecimento repassado, apoio em todas as etapas deste trabalho, amizade e co-orientação.

Ao Prof. Dr. Rosildo Santos Paiva que sempre me incentivou na minha formação.

Ao Prof. Dr. Evonnildo Costa Gonçalves por ter disponibilizado o laboratório para o desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular, pela dedicação e conhecimentos transmitidos.

Ao Dr. José Antônio Picanço Diniz, Coordenador do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Evandro Chagas por ter contribuído no desenvolvimento das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e contraste de interferência diferencial.

À Prof. Dra. Edilene Oliveira da Silva, Coordenadora do Laboratório de Biologia Ultraestrutural da Universidade Federal do Pará por ter disponibilizado a estrutura para a realização da Microscopia Eletrônica de Transmissão.

À Fernanda, técnica do Laboratório de Biologia Estrutural, pelos ensinamentos e grande ajuda na execução das técnicas de microscopia.

À Medica Veterinária Michelle Velasco por ter me acompanhado em todas as etapas deste trabalho, repassado seus conhecimentos, incentivo e amizade

A Luciana de Cássia pelos ensinamentos, auxílio no desenvolvimento das técnicas moleculares, amizade, paciência e dedicação que a fazem ser uma profissional exemplar.

Ao Fábio Daniel por ter me ajudado no desenvolvimento da filogenia, pela amizade e apoio.

Aos meus amigos do Laboratório de Tecnologia Biomolecular (LTB) da Universidade Federal do Pará Emanuelle Argôlo, Leopoldo Moraes, Thaís Reis, Laise, Pablo Moraes, Ruan Monteiro, Fabrísia D' Encarnação e Rafaella Baraúna.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo pela amizade e apoio na realização deste trabalho, em especial, a técnica Patrícia Santos Sacco.

A Médica Veterinária Marcela Videira pela amizade e incentivo.

A minha mãe Maria das Graças e meus irmãos Levy Dias e Leila Dias pelo carinho, palavras de incentivos diante das dificuldades e confiança.

A minha sobrinha Naely Dias que mudou a minha vida com seu exemplo de superação e esperança.

A minha mãe de coração, Maria Ivanilda Santana Barbosa pelo carinho e por torcer pela minha vitória.

A minha amiga Zila Sidonio pela amizade, força e apoio em todos esses anos.

Ao meu grande amigo e irmão André Santana por está ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

A minha amiga Leila Oliveira pelas palavras de conforto e longa amizade.

A todos os docentes do curso de Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

A CAPES pelo apoio financeiro disponibilizando a bolsa de doutorado.

## RESUMO

A dourada *Brachyplatystoma rousseauxii* e a pratinheira *Mugil curema* são espécies de peixes de considerável consumo e valor comercial encontrados na costa estuarina do estado do Pará. Os microparasitos dos filos Apicomplexa, Microspora e Myxozoa são organismos que podem ser encontrados parasitando vertebrados e invertebrados, entre eles os peixes, alguns com potencial patogênico, zoonótico podendo acarretar impactos econômicos. Para conhecer a fauna mioparasitária que acomete peixes, 62 exemplares de *B. rousseauxii* e 58 de *M. curema* capturados na costa estuarina do município de Vigia de Nazaré e do Distrito de Mosqueiro, município de Belém, estado do Pará foram examinados conforme métodos e técnicas de análise morfológica (microscopia de luz), ultraestrutural (microscopia eletrônica de transmissão) e de biologia molecular (análise filogenética). Foi observada a ocorrência de três filos (três em *B. rousseauxii* e dois em *M. curema*) nos hospedeiros capturados nas duas localidades, mais o maior índice parasitário foi determinado nos exemplares das duas espécies capturados na costa estuarina do município de Vigia de Nazaré, com maior ocorrência de microparasitos dos filos Apicomplexa e Myxozoa, além do multiparasitismo em *B. rousseauxii*, a análise morfológica revelou a presença de *Calyptospora* sp. (Apicomplexa), *Ellipsomyxa* sp., *Henneguya* sp., *Myxobolus* sp. e *Meglishcha* sp. (Myxozoa) e *Kabatana* sp. (Microspora) em *B. rousseauxii* e *Ellipsomyxa* sp., *Myxobolus* sp. e um microparasito do filo Microspora em *M. curema*. Os dados das análises morfológicas e ultraestruturais dos Myxospora encontrados em *B. rousseauxii* e *M. curema* são sugestivos de novas espécies de microparasitos nesses dois hospedeiros. Os dados da análise filogenética não forneceram resultados que permitiram a classificação de *Kabatana* sp. (Microspora) e *Henneguya* sp. (Myxozoa) encontrados parasitando *B. rousseauxii* como novas espécies de microparasitos nesse hospedeiro devido ao baixo valor de *bootstrap*, mas pela análise da distância *p* foi possível sugerir que se tratam de novas espécies. Estudos a respeito de microparasitos em peixes amazônicos são necessários para o conhecimento das ocorrências, caracterização de novas espécies, potencial patogênico nos hospedeiros e eventual risco para o consumidor.

Palavra-chave: Peixe. Microparasitos. Morfologia. Filogenia, Amazônia.

## ABSTRACT

The gilthead bream *Brachyplatystoma rousseauxii* and white mullet *Mugil curema* are species of fish consumption and considerable commercial value found in estuarine coast of Pará. The microparasites phyla Apicomplexa, Microspora and Myxozoa are organisms that can be found parasitizing vertebrates and invertebrates, including the fish, some pathogenic potential and even zoonotic and economic impact. To discover the fauna microparasites affecting fish, 62 specimens of *B. rousseauxii* and 58 *M. curema* estuarine captured on the coast of the city of Vigia de Nazare and Mosqueiro District, in Belem, Para state were examined as methods and techniques for morphological analysis (microscopy light), ultrastructural (transmission electron microscopy, TEM) and molecular biology (phylogenetic analysis). It was observed that there are three phyla (three in *B. rousseauxii* and two in *M. curema*) captured hosts in the two locations, plus the largest parasitic index was determined in specimens of both captured on the coast of the estuarine Vigia de Nazare, higher incidence of co microparasites phyla Apicomplexa and Myxozoa, beyond multiparasitism in *B. rousseauxii*. Morphological analysis revealed the presence of *Calyptospora* sp. (Apicomplexa), *Ellipsomyxa* sp., *Henneguya* sp., *Myxobolus* sp. and *Meglishcha* sp. (Myxozoa) and *Kabatana* sp. (Microspora) in *B. rousseauxii* and *Ellipsomyxa* sp., *Myxobolus* sp. and Microspora phylum microparasite in *M. curema*. The data analysis of morphological and ultrastructural Myxospora found in *B. rousseauxii* and *M. curema* are suggestive of new species microparasites these two hosts. Phylogenetic analysis of the data did not provide results that allow the classification of *Kabatana* sp. (Microspora) and *Henneguya* sp. (Myxozoa) found parasitizing *B. rousseauxii* microparasites as new species in this host due to low bootstrap value, but by analyzing the distance  $p$  was possible to suggest that these are new species. Studies about microparasites in Amazonian fish are needed for the knowledge of the occurrences, characterization of new species, the pathogenic potential hosts and possible risk to the consumer.

Keyword: Fish. Microparasites. Morphological. Phylogeny. Amazon.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Desenho esquemático da organização morfológica de um grupo de oocito.....	19
Figura 2.	Desenho esquemático das fases do ciclo de vida do <i>Calyptospora spinosa</i> .....	21
Figura 3.	Desenho esquemático das etapas sucessivas da invasão de Apicomplexa.....	22
Figura 4.	Desenho esquemático tridimensional do esporo do <i>Microsporidium brevirostris</i> e morfologia ultraestrutural em secção longitudinal.....	25
Figura 5.	Eversão do tubo polar durante a germinação do esporo de microsporídeo.....	27
Figura 6.	Ciclo de vida de um microsporídeo ilustrando a fase do esporo.....	28
Figura 7.	Desenho esquemático de esporos de Mixosporídios.....	31
Figura 8.	Ciclo evolutivo de Myxoporea.....	32
Figura 9.	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> Casteunau, 1855.....	45
Figura 10.	<i>Mugil curema</i> Valenciennes, 1836.....	45
Figura 11.	Localização das áreas de pesca de dourada e pratiqueira.....	46
Figura 12.	Percentual de ocorrência de microparasitos em <i>B. rousseauxii</i> no período de março de 2012 a dezembro de 2011.....	50
Figura 13.	Relação da ocorrência de parasitismos entre o distrito de Mosqueiro e município de Vigia de Nazaré, no período de março de 2010 a junho de 2012.....	51
Figura 14.	Percentual de ocorrência de microparasitos em <i>M. curema</i> no período de março a dezembro de 2011.....	52
Figura 15.	Relação da ocorrência de parasitismos entre o Distrito de Mosqueiro e município de Vigia de Nazaré, no período de março de 2010 a junho de 2012.....	53

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 16.	Corte histológico do fígado de <i>Brachyplastytma rousseauxii</i> parasitado por <i>Calyptospora</i> sp.....	65
Figura 17.	<i>Brachyplastytma rousseauxii</i> . Fotomicrografia de luz: esporos de <i>Calyptospora</i> sp....	66
Figura 18.	<i>Brachyplastytma rousseauxii</i> . Fotomicrografia de luz: Xenoma de <i>Kabatana</i> sp. parasitando brânquia e esporos de <i>Kabatana</i> sp. ....	81
Figura 19.	<i>Brachyplastytma rousseauxii</i> . Fotomicrografia de luz: Esporo de <i>Kabatana</i> sp. parasitando brânquia.....	82
Figura 20.	Árvore filogenética de <i>Neighbor-Joining</i> .....	84
Figura 21.	<i>Brachyplastytma rousseauxii</i> . Fotomicrografia de luz: <b>A.</b> Esporos de <i>Ellipsomyxa</i> sp., parasitando vesícula biliar, em preparação a fresco e Contraste por interferência diferencial.....	100
Figura 22.	<i>Brachyplastytma rousseauxii</i> . <i>Henneguya</i> sp. <b>A.</b> Brânquia apresentando cistos. <b>B.</b> Preparação a fresco de filamentos branquiais apresentando cisto rompido e esporos livres. <b>C.</b> Esporos com cápsulas polares. <b>D.</b> Contraste por interferência diferencial de esporos.....	102
Figura 23.	<i>Brachyplastytma rousseauxii</i> . Eletromicrografia de transmissão: <b>A.</b> Corte transversal do esporo de <i>Henneguya</i> sp. <b>B.</b> Visão transversal de um esporo de <i>Henneguya</i> sp. <b>C.</b> Visão longitudinal de uma cápsula polar	103
Figura 24.	Desenho esquemático de <i>Henneguya</i> sp. parasita de <i>B. rousseauxii</i>	104
Figura 25.	Árvore filogenética de <i>Neighbor-Joining</i> (NJ) .....	107
Figura 26.	<i>B. rousseauxii</i> . Fotomicrografia de luz com contraste por interferência diferencial de esporos de <i>Meglishchia</i> sp. parasitando vesícula biliar...	110
Figura 27.	<i>Brachyplastytma rousseauxii</i> . <i>Myxobolus</i> sp.. Fotomicrografia de luz <b>A.</b> Filamento branquial apresentando cisto do parasito e esporos livres. <b>B.</b> Esporos (seta) com observação das cápsulas polares. Eletromicrografia de transmissão: <b>C.</b> Corte transversal do esporo. <b>D.</b> Esporo em corte longitudinal. <b>E.</b> Corte longitudinal de um esporo em maturação	112
Figura 28.	Desenho esquemático de <i>Myxobolus</i> sp. parasitando de <i>B. rousseauxii</i>	113
Figura 29.	<i>Mugil curema</i> . <i>Myxobolus</i> sp.. Fotomicrografia de luz: <b>A.</b> Corte histológico de brânquia <b>B.</b> Contraste por interferência diferencial de esporo Eletromicrografia de transmissão: <b>C.</b> Esporos seccionados em diferentes níveis. <b>D.</b> Corte transversal do esporo. <b>E.</b> Corte transversal do esporo Visão tangencial do esporo.....	117
Figura 30.	Desenho esquemático de <i>Myxobolus</i> sp. parasita de <i>Mugil curema</i> .....	118

## LISTA DE TABELAS

Quadro 1.	Espécies de Calyptosporidae, seus hospedeiros e os autores que as descrevera...	18
Quadro 2.	Registros de espécies do gênero <i>Calyptospora</i> registrados parasitando peixes no litoral brasileiro.....	23
Quadro 3.	Registros de microsporídio parasitando peixes capturados no litoral brasileiro.....	29
Quadro 4.	Registros do gênero <i>Myxobolus</i> parasitando peixes capturados no litoral brasileiro.....	34
Quadro 5.	Registros do gênero <i>Henneguya</i> encontrados em peixes capturados no litoral brasileiro.....	35
Quadro 6.	Ocorrência e local de infecção de microparasitos em <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> capturados no Distrito de Mosqueiro e município de Vigia de Nazaré no período de março de 2010 a maio de 2012.....	48
Quadro 7.	Ocorrência e local de infecção de microparasitos em <i>Mugil curema</i> , capturados no Distrito de Mosqueiro e município de Vigia de Nazaré no período de março de 2010 a maio de 2012.....	51
Quadro 8.	Comparação das dimensões ( $\mu\text{m}$ ) dos esporos de <i>Calyptospora</i> spp., parasitando peixes teleósteo do litoral brasileiro.....	67
Quadro 9.	Iniciadores utilizados para amplificação do gene 18S rDNA.....	78
Quadro 10.	Número de acesso do <i>Genbank</i> das sequências de 18S rDNA de 27 microsporídios parasitos de espécies de peixes utilizado para análise filogenética.....	80
Tabela 01.	Distância $p$ das amostras analisadas e das sequências disponíveis no <i>Genbank</i> para região 18S.....	85
Quadro 12.	Iniciadores utilizados para amplificação do gene 18S rDNA.....	97
Quadro 13.	Número de acesso do <i>Genbank</i> das sequências de 18S rDNA de 17 mixosporídios parasitos de espécies de peixes utilizado para análise filogenética.....	99
Tabela 02.	Comparação das dimensões ( $\mu\text{m}$ ) dos esporos de <i>Henneguya</i> spp., parasitando peixes teleósteo do litoral brasileiro.....	105
Tabela 03.	Distância $p$ das amostras analisadas e das sequências disponíveis no <i>Genbank</i> para região 18S.....	109
Tabela 04.	Comparação das dimensões ( $\mu\text{m}$ ) dos esporos de <i>Myxobolus</i> spp., parasitando peixes teleósteo do litoral brasileiro.....	114
Tabela 05.	Comparação das dimensões ( $\mu\text{m}$ ) dos esporos de <i>Myxobolus</i> spp., parasitando peixes teleósteo do litoral brasileiro.....	119

## **LISTA DE SIGLAS**

DIC – Contraste de Interferência Diferencial

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

LTB – Laboratório de Tecnologia Biomolecular

LPCA – Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo

MET – Microscopia Eletrônica Transmissão

NBCI – Centro Nacional de Informações de Biotecnologia

PCR – Reação de Cadeia de Polimerase

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

UFRA – Universidade Federal Rural da Amazônia

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
3.1. MICROPARASITISMO EM PEIXES.....	17
3.2. APICOMPLEXA .....	17
3.2.1. Posição Taxonômica.....	18
3.2.2. Morfologia.....	18
3.2.3. Ciclo Biológico.....	20
3.2.4. Patologia.....	21
3.2.5. Coccidiose na ictiofauna brasileira.....	22
3.3. MICROSPORÍDIO.....	23
3.3.1. Posição Taxonômica.....	24
3.3.2. Morfologia.....	24
3.3.3. Ciclo Biológico.....	26
3.3.4. Patologia.....	28
3.3.5. Microsporidiose em peixes do litoral brasileiro .....	29
3.4. MIXOSPORÍDIOS.....	29
3.4.1. Posição Taxonômica.....	29
3.4.2. Morfologia.....	30
3.4.3. Ciclo Biológico.....	31
3.4.4. Patologia.....	32
3.4.5. Mixosporidiose em peixes do litoral brasileiro.....	33
3.5. EPIDEMIOLOGIA DE MICROPARASITOS EM PEIXES.....	36
3.6. MICROPARASITOS E SAÚDE COLETIVA.....	38
3.7. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO.....	40
<b>4. CAPÍTULO I: OCORRÊNCIA DE MICROPARASITOS EM <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> e <i>Mugil curema</i></b> .....	42
<b>5. CAPÍTULO II: PARASITISMO DE <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> POR <i>Calyptospora</i> sp. ( APICOMPLEXA: Calyptosporidae): PRIMEIRO RELATO</b> .....	59
<b>6. CAPÍTULO III: <i>Kabatana</i> sp. (Microsporidia Balbiani, 1882): UMA NOVA ESPÉCIE PARASITÁRIA DE <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i></b> .....	72
<b>7. CAPÍTULO IV: PARASITISMO POR MIXOSPORÍDIO EM <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> E <i>Mugil curema</i>: PRIMEIRO RELATO</b> .....	92
<b>8. CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	129
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	130

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura (2012), a produção pesqueira brasileira no ano de 2010 foi de 1.264.765t, com um incremento de 2% em relação ao ano de 2009. A pesca marinha continuou sendo a principal fonte de produção de pescado nacional, sendo responsável por 536.455t e 42,4% do total de pescado capturado, seguida pela aquicultura continental com 394.340t (31,2%), pesca extrativa continental (248.911t e 19,7%) e aquicultura marinha (85.057t, 6,7%). Algumas das espécies que contribuíram para este cenário foram a corvina (*Pachyurus* spp.), o bonito-listrado (*Katsuwonus pelamis*), a pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), a sarda (*Sarda sarda*), a sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*), a tainha (*Mugil* spp.) na pesca marinha e o curimatã (*Prochilodus* spp.), o jaraqui (*Semaprochilodus* spp.), a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), a pescada (*Plagioscion* spp.) e a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) na pesca continental.

O litoral do estado do Pará possui um alto potencial para produção pesqueira, devido principalmente aos numerosos rios e estuários que desaguam no Oceano Atlântico, formando um ambiente aquático complexo, com alta produtividade biológica. A substancial biomassa de espécies de peixes dessa região é explorada por frotas artesanais e industriais (BARTHEM; FABRÉ, 2004).

Este contexto possibilita ao estado desempenhar um importante papel no cenário da atividade pesqueira do Brasil, sendo um dos primeiros estados em volume de captura (ISAAC; SANTOS; NUNES, 2008). Em 2010, a região Norte assinalou a terceira maior produção de pescado do país com 410.532t, respondendo por 32% da produção nacional e o estado do Pará foi responsável por 143.078t, assumindo o posto de segundo maior produtor de pescado, sendo ultrapassado apenas por Santa Catarina que produziu 183.770t (BRASIL, 2012).

Algumas espécies de peixes que vêm contribuindo consideravelmente para a produção pesqueira do estado do Pará são *Cynoscion acoupa* (pescada-amarela), *Brachyplatystoma vaillantii* (piramutaba), *Arius* sp. (gurijuba), *B. rousseauxii* (dourada) e *Hipophthalmus marginatus* (mapará). Em 2007, a produção nacional das espécies da família Mugilidae foi de 21.864t e a produção paraense foi de 530,5t; nesse mesmo ano a produção nacional de *B. rousseauxii* (dourada) alcançou 11.376,5t e a paraense 7.652,5t (IBAMA, 2007).

Os municípios de Belém e Vigia de Nazaré são os maiores produtores de pescados do estado do Pará no município de Belém, as capturas são desembarcadas pelos portos de Baía

do Sol, Ponte do Cajueiro (no Distrito de Mosqueiro), Icoaraci, Ver-o-Peso e pelas indústrias beneficiadoras. O município de Vigia de Nazaré tem com principal atividade econômica a pesca e seus principais portos desembarcadores de capturas são os de Arapiranga, Mercado Municipal e das indústrias beneficiadoras (PARÁ, 2008).

A espécie *B. rousseauxii*, popularmente conhecida como dourada, possui como características morfológicas principais o grande porte (maior tamanho conhecido: 192 cm), cabeça prateada e achatada, corpo dourado e presença de barbilhões maxilares curtos (BARTHEM; GOULDING, 1997). É uma espécie piscívora (consumindo peixes inteiros), que realiza grandes migrações, locomovendo-se desde o estuário até as cabeceiras do Amazonas e alguns de seus efluentes, onde ocorre a desova. Seus ovos e suas larvas são carregados para os rios até os estuários, locais de crescimentos e alimentação das formas jovens (SANTOS; FERREIRA; ZUANON, 2006).

A espécie *M. curema* (pratiqueira) tem o corpo prateado, sendo mais escuro na parte superior. As nadadeiras são amareladas e a ponta da segunda nadadeira é enegrecida enquanto que a caudal e a peitoral apresentam pigmentação escura esparsa. Além disso, a nadadeira peitoral tem uma mancha mais escura na sua base que é mais evidente no lado interno da nadadeira (MENEZES, 1983). Possui ampla distribuição, ocorrendo em águas tropicais e subtropicais de todo o mundo, principalmente na região costeira estuarina (MENEZES, 1983). São explorados comercialmente em todas as regiões onde ocorrem, constituindo assim uma parte importante da alimentação humana (SILVA; ARAÚJO, 2000). *M. curema* é popularmente denominada de “parati” no Sudeste e Sul (SZPILMAN, 2000), “tainha” no Nordeste e Norte (MENEZES, 1983), sendo os seus filhotes conhecidos, na última região, como “pratiqueira”.

O incremento na produção pesqueira aumentou, crescendo também a importância dos estudos ictiosanitários, pois os peixes são susceptíveis a diferentes enfermidades de origem bacteriana, micótica, virótica e parasitária (VÁZQUEZ-LÓPEZ; ARMAS-SERRA; RODRÍGUEZ-CAABEIRO, 2001; PRADO; CAPUANO, 2006). Em relação às infecções parasitárias, existe uma grande diversidade de patógenos que parasitam os peixes, destacando-se os microsporídios, mixosporídios e os coccídios (BÉKÉSI, 1992; MARTINS et al., 1999; AZEVEDO et al., 2009).

Alguns microparasitos como os microsporídios têm sido frequentemente associados a relevantes aspectos de saúde pública, por serem prováveis agentes de doenças parasitárias em humanos imunodeprimidos (CANNING; LOM, 1986; WEBER et al., 1994; DIDIER et al.,

2004; DIDIER; WEISS, 2006). Gonçalves et al. (2006) sugerem que as microsporidioses em humanos são parasitoses zoonóticas emergentes subdiagnosticadas.

O conhecimento da fauna parasitária de uma determinada região contribui para aperfeiçoar as técnicas de manejo na piscicultura, implantar sistemática de inspeções sanitárias nas indústrias e melhorar a vigilância sanitária nos locais que comercializam o pescado (DIAS, 2008; DIAS; SÃO CLEMENTE; KNOFF, 2010).

No estado do Pará são poucos os estudos na área de ictioparasitoses, especialmente em relação aos microparasitos, sendo necessárias pesquisas que evidenciem as doenças que acometem os peixes. Segundo Eiras (1994) essas enfermidades podem ocasionar a morte dos hospedeiros, a infertilidade quando o parasitismo localiza-se nas gônadas e o desequilíbrio do ecossistema.

O presente estudo visa contribuir para o conhecimento da fauna microparasitária que acomete *Brachyplatystoma rousseauxii* e *Mugil curema*, desembarcados no município de Vigia de Nazaré e no Distrito de Mosqueiro, município de Belém, estado do Pará.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a fauna microparasitária que acomete a dourada (*Brachyplatystoma rouseauxii*) e a pratiqueira (*Mugil curema*), desembarcados no município de Vigia de Nazaré e no Distrito de Mosqueiro, município de Belém, estado do Pará.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a ocorrência parasitária e descrever as características morfológicas e ultraestruturais dos microparasitos que acometem *B. rouseauxii* e *M. curema* da Amazônia Oriental.
- Identificar as prováveis novas espécies de microparasitos.
- Analisar as relações filogenéticas dos microparasitos observados.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. MICROPARASITISMO EM PEIXES

Os estudos relacionados com parasitos e patógenos de organismos aquáticos, principalmente daqueles hospedeiros com potencial para o cultivo e comercialização, têm aumentado consideravelmente a relevância face ao aumento significativo destas atividades no Brasil e no mundo (LUQUE, 2004).

O parasitismo é um fenômeno frequente, senão constante nos peixes e as enfermidades parasitárias, manifestam-se quando as condições do meio ambiente permitem a proliferação do parasito (KINKELIN; MICHEL; GHITTINO, 1991).

Os parasitos de peixes possuem uma distribuição mundial, afetando todas as espécies de peixes, tanto de águas tropicais como de águas polares, em qualquer que seja o habitat do hospedeiro e o nicho ecológico (EIRAS, 1994).

Eiras (1994) avaliou a importância econômica de parasitoses de peixes e constatou que algumas podem acarretar redução de peso em seu hospedeiro, frequentemente acompanhada de diminuição do conteúdo lipídico e aumento da quantidade de água no músculo, aumentando a suscetibilidade desses animais a infecções por agentes oportunistas, como fungos e bactérias. Na piscicultura, estes danos contribuem para a diminuição da rentabilidade da exploração decorrente do aumento da mortalidade ou por diminuição dos rendimentos (KINKELIN; MICHEL; GHITTINO, 1991).

Algumas espécies são importantes agentes patogênicos e podem provocar consideráveis prejuízos econômicos. Neste contexto, um dos microparasitos mais importante é *Myxobolus cerebralis* que é o agente etiológico da doença do rodopio, parasitose extremamente grave de *Oncorhynchus mykiss* (truta-arco-íris) (EIRAS, 1994).

Os microparasitos abrangem formas patogênicas, tendo um ciclo de vida, total ou parcial, ocorrendo em hospedeiros, quase todos pertencentes aos diferentes grupos taxonômicos do reino animal, e em raros casos, ao reino vegetal (MATOS et al., 2004a).

Em relação aos problemas sanitários, alguns microparasitos podem acarretar danos significativos ao hospedeiro. Martins et al. (1997) estudando pacu (*Piaractus mesopotamicus*) verificaram a presença de cistos do gênero *Henneguya* nos filamentos branquiais secundários, deslocando os filamentos vizinhos e distanciando o contato célula à célula, acarretando na

redução da área de trocas metabólicas, hiperplasia das células caliciformes e aumento na produção de muco, fatores que prejudicam as funções das brânquias.

Matos et al. (1999) observaram nos filamentos das brânquias de *Bunocephalus coracoideus* (rebeca) cistos de *Myxobolus brazilienses*, com evidentes aspectos de lise e, em alguns casos, ruptura do epitélio branquial.

Alguns autores sugerem que os microparasitos do filo Microsporida sejam organismos oportunistas em humanos, principalmente em pacientes imunodeprimidos, que apresentam transtornos gastrointestinais como dor abdominal, náuseas e diarreia (McCLELLAND; MURPHY; CONE, 1997; BOREHAM et al., 1998).

Dentre os microparasitos de interesse ictiossanitário encontram-se gêneros e espécies dos filamentos Apicomplexa, Microspora e Myxozoa. Estes filamentos apresentam registros de parasitismo em várias espécies de peixes, inclusive nos de valor comercial (BÉKÉSI; MOLNÁR, 1991; BONAR et al., 2006; EIRAS et al., 2007).

### 3.2. APICOMPLEXA

O filo Apicomplexa compreende protozoários que são parasitas intracelulares de uma grande variedade de animais. Este filo inclui importantes patógenos como *Plasmodium* e *Toxoplasma* os causadores da malária e Toxoplasmose, respectivamente. Outras doenças importantes causadas por representantes deste filo são a babesiose, as coccidioses, as criptosporidioses, a cyclosporose e teilerioses (LANG-UNNASCH et al., 1998)

Há muitos anos é documentada a importância econômica destes agentes em infecções de mamíferos e aves. Por outro lado, pesquisas sobre este filo parasitando peixes possuem informações limitadas a respeito da sua importância (ALBUQUERQUE; BRASIL-SATO, 2010). Dentre os representantes desta ordem de interesse ictiossanitário estão os coccídios, pois alguns destes parasitos são potencialmente patogênicos para os peixes (AZEVEDO; MATOS; MATOS, 1993, 1995).

### 3.2.1 Posição Taxonômica

O filo Apicomplexa Levine, 1970 pertence a subordem Eimeriorina Léger, 1911, a classe Sporozoa, subclasse Coccídiá. O maior subgrupo deste filo é a subordem Eimeriorina Leger, 1991, que possui 10 famílias, 42 gêneros e mais de 2.000 espécies descritas (DUSZYNSKI; COUCH; UPTON, 2000; COSTA et al., 2007). Dentre as famílias os coccídios possuem interesse ictiossanitário, sendo a principal família a Calyptosporidae descrita em 1984 por Overstreet, Hawkins e Fournié. Esta família possui cinco espécies conhecidas, conforme descrito no Quadro 1.

Em peixes foram encontrados coccídios infectando diferentes órgãos e tecidos, mas nem todos apresentaram patogenicidade (AZEVEDO; MATOS; MATOS, 1995; BONAR et al. 2006; CASAL et al. 2007; ALBUQUERQUE; BRASIL-SATO, 2010). Em relação aos coccídios, Belova e Krylov (2000) estimam que já foram identificadas 250 espécies.

Quadro 2. Espécies de Calyptosporidae, seus hospedeiros e os autores que as descreveram.

Espécie	Hospedeiro	Autores
<i>Calyptospora funduli</i>	Cyprinodontiformes	Overstreet, Hawkins e Fournié (1984)
<i>Calyptospora empristica</i>	<i>Fundulus notti</i>	Fournié, Hawgins e Overstreet (1985)
<i>Calyptospora serrasalmi</i>	<i>Serrasalmus striolatus</i>	Cheung, Nigrelli e Ruggieri (1986)
<i>Calyptospora tucunarensis</i>	<i>Cichla ocellaris</i>	Békési, Molnár (1991)
<i>Calyptospora spinosa</i>	<i>Crenicichla lepidota</i>	Azevedo, Matos e Matos (1993)

No Brasil três espécies foram registradas *Calyptospora tucunarensis* (BÉKÉSI; MOLNÁR, 1991), *Calyptospora spinosa* (AZEVEDO; MATOS; MATOS, 1993) e *Calyptospora serrasalmi* (CASAL et al., 2007).

### 3.2.2 Morfologia

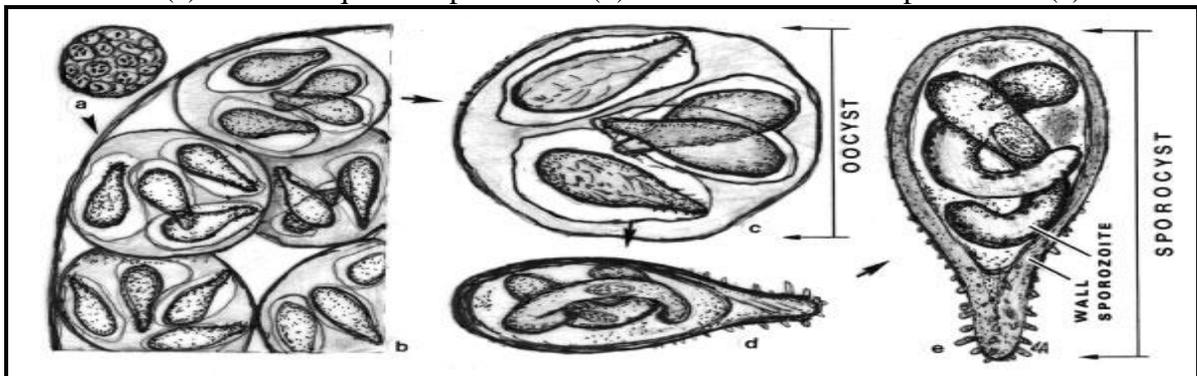
Os espécimes do filo Apicomplexa são caracterizados pela presença do complexo apical, composto por organelas secretórias especializadas, como róptrias e micronemas e de elementos do citoesqueleto, como os anéis polares e conóide, este último apenas nos coccídeos, subclasse que inclui *Toxoplasma gondii*. As róptrias são organelas maiores que os micronemas e em formato de clava, apresentando a região basal mais larga, com uma matriz com aspecto esponjoso, e uma porção mais afilada, voltada para a extremidade apical (SOUZA et al.,2010).

Os micronemas são pequenas estruturas em forma de bastão, que só são encontradas na extremidade anterior dos protozoários. São limitados por uma unidade de membrana e apresentam um conteúdo homogêneo e eletrondenso. Possuem um grande número de proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático que podem ter domínios adesivos ou mediar interações com componentes da superfície da célula hospedeira (SOUZA et al., 2010).

Os micronemas e as róprias secretam seus conteúdos durante os processos de adesão e invasão. Outra organela importante são os grânulos densos, organelas esféricas, distribuídas por todo o corpo do parasito (SOUZA et al., 2010).

Com relação à morfologia de *Calyptospora*, causador de coccidiose em peixes, observa-se que o formato de oocistos com quatro esporocistos, sendo que no interior de cada um destes esporocistos nota-se a presença de dois esporozoítos (Figura 1) (AZEVEDO et al., 1993;1995). Este gênero é semelhante a *Eimeria* spp. apresentando a morfologia 4:8 e alta especificidade parasitária.

Figura 1. Desenho esquemático da organização morfológica de um grupo de oocisto (a,b) e um oocisto (c) contendo quatro esporocistos (d) cada um com dois esporozoítos (e).



Fonte: Casal et al. (2007).

Duszynski, Solangi e Oversteet (1979) encontraram hospedeiros diferentes *C. funduli* no Mississippi, Estado Unidos, apresentando oocisto ovóide com dimensões entre 20,0-30,0  $\mu\text{m}$ , e esporocisto com 9,0-11,0  $\mu\text{m}$  de comprimento por 5,0-7,0  $\mu\text{m}$  de largura. Na mesma região, Fournie et al. (1985) descreveram *C. empristica* com oocisto elipsóide medindo 19,6-24,5  $\mu\text{m}$  e esporocisto 7,0-9,5  $\mu\text{m}$  de comprimento e 4,5-7,5  $\mu\text{m}$  de largura.

No Brasil, Cheung, Nigrelli, Ruggieri (1986) registraram oocisto piriforme de *C. serrasalmi*, medindo 22,0-25,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro e esporocisto 10,0-11,5  $\mu\text{m}$  por 5,0-6,0  $\mu\text{m}$  e Bonar et al. (2006) descreveram *Calyptospora* sp. com oocisto também de formato piriforme,

medindo 16,0-22,0 $\mu$ m e esporocistos com 8,0-10,0 $\mu$ m de comprimento por 4,0-5 $\mu$ m de largura.

Azevedo, Matos e Matos (1993), encontraram *C. spinosa* no rio Amazonas, Brasil, que apresentava oocistos esféricos medindo 21,1-23,4 $\mu$ m, cada oocisto continha quatro esporozoítos, estes com formato elipsoidal com 8,9-9,5 $\mu$ m de comprimento por 3,4-4,1 $\mu$ m de largura. Ainda no mesmo rio foi descrito por Casal et al (2007), *C. serrasalmi* com oocistos esféricos medindo cerca de 25,5 $\mu$ m de diâmetro e esporocisto de formato piriforme com comprimento de 11,8 $\mu$ m e largura 6,0 $\mu$ m. Em Minas Gerais, no rio São Francisco, Albuquerque e Brasil-Sato (2010), após a morfometria de *Calyptospora* sp. descreveram oocisto com 24,5 $\mu$ m de diâmetro e esporocisto 11,5 $\mu$ m por 4,5 $\mu$ m.

### 3.2.3. Ciclo Biológico

Overstreet, Hawkins e Fournie (1984) e Fournie, Hawkins e Overstreet (1985) realizaram infecções experimentais de diferentes espécies do gênero *Calyptospora*, visando conhecer seu ciclo de vida. No entanto, ele ainda é pouco conhecido. A espécie melhor descrita é *C. funduli* (OVERSTREET; OGLE, 1981) sendo por muito tempo foi denominada de *Eimeria funduli*, mas Overstreet et al. (1984) propuseram a criação do gênero *Calyptospora*, devido necessitar de um hospedeiro intermediário.

O ciclo de vida dos coccídios pode ser de dois tipos: monoxeno e heteroxeno, neste último envolve um hospedeiro intermediário e um paratênico. Algumas pesquisas mostram que as fases de merogonia e gametogonia ocorrem em diferentes espécies de camarão da família Palaemonidae e a esporogonia em peixes teleósteos (SOLANGI; OVERSTREET 1980; DYKOVÁ; LOM 1981; OVERSTREET; OGLE, 1981; OVERSTREET, HAWKINS e FOURNIE, 1984; FOURNIE, HAWKINS e OVERSTREET, 1985; AZEVEDO; MATOS; MATOS, 1995).

Na região Amazônica, Thatcher e Neto (2006) estudando coccídios de peixes mencionaram que, provavelmente, o camarão (*Macrobrachium* spp.) estaria envolvido como hospedeiro intermediário, e a transmissão ocorreria quando o peixe ingerisse o camarão infectado.

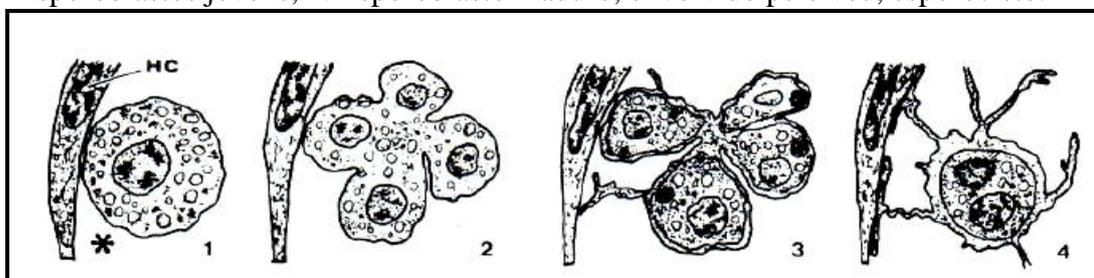
Vários autores observaram a necessidade de um hospedeiro intermediário para completar o ciclo de vida dos espécimes deste gênero, entretanto Oliveira et al. (1993),

estudando a infecção por *C. funduli* em *Opsanus beta*, verificaram que todas as fases do ciclo de vida ocorreram no fígado do hospedeiro.

A forma infectante do Apicomplexa é o esporozoítio, que na célula hospedeira transforma-se em esquizonte, que origina vários merozoítos (merogonia), cuja quantidade depende da espécie. Esta fase da reprodução assexuada é geralmente denominada esquizogonia ou merogonia, o que em alguns casos não será apropriada, uma vez, que podem formar dois merozoítos por cissiparidade. Estes irão originar os gametas, por diferenciação, que se fundem dando origem ao zigoto (gametogonia). O zigoto irá originar o oocisto que geralmente contém quatro esporozoítos (esporogonia) e a liberação do esporozoítio assegura a infecção de novos hospedeiros (EIRAS, 1994).

Em alguns casos, observa-se células iniciais do ciclo de vida ou formação dos vacúolos parasitóforos, quando se encontra diferentes fases do ciclo de vida, variando a forma dos esporocistos, de arredondada a elipsoide (Figura 2) (AZEVEDO; MATOS; MATOS, 1993; 1995).

Figura 2. Esquema das fases do ciclo de vida de *Calyptospora spinosa*: 1. Zigoto,\* vacúolo parasitóforo; HC: célula hospedeira; 2. Formação de esporoblasto; 3. Esporoblastos jovens; 4. Esporoblasto maduro, envolvido pelo véu, esporocisto.

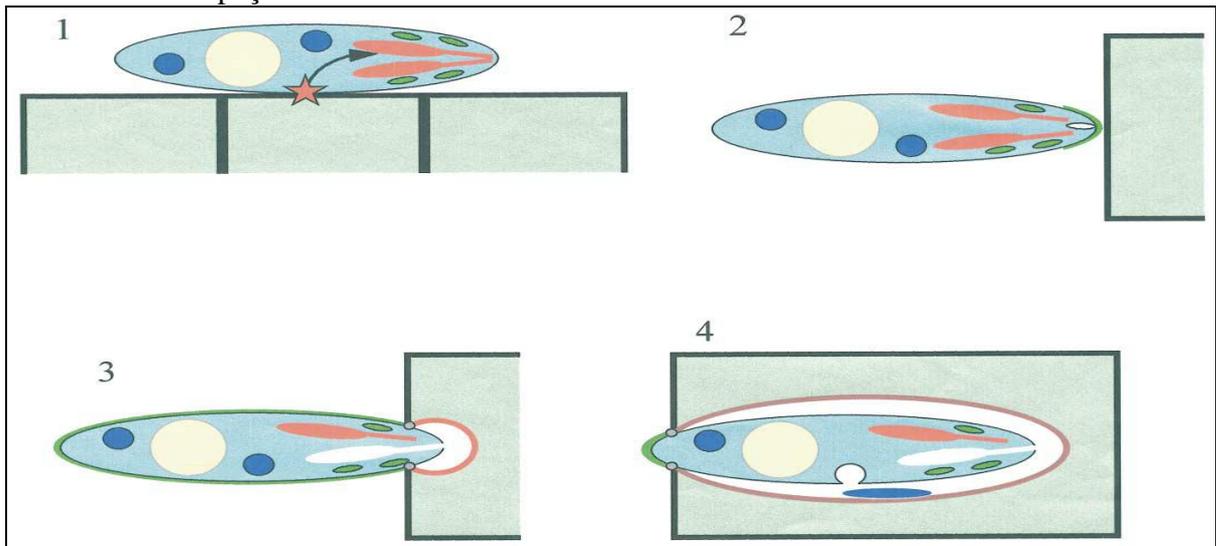


Fonte: Azevedo et al., 1995.

### 3.2.4. Patologia

Algumas espécies de Apicomplexa parecem ter especificidade parasitária enquanto que outras foram descritas para dezenas de hospedeiros de vários continentes (EIRAS, 1994). A maioria dos coccídios que acometem peixes infectam o epitélio intestinal, mas um número relativo deles desenvolve-se também no rim, baço, fígado, bexiga natatória e serosa (MOLNÁR et al., 2006). Algumas espécies de Apicomplexa formas parecem ter especificidade parasitária, enquanto que outras foram descritas para dezenas de hospedeiros de vários continentes (EIRAS, 1994). Dubremetz et al. (1998) descreveram a invasão deste microparasito na célula hospedeira, conforme a Figura 3.

Figura 3. Desenho esquemático das etapas sucessivas da invasão de Apicomplexa: (1) o esporozoítio entra em contato com a superfície da célula hospedeira e um sinal é traduzido a partir da superfície (estrela) para o ápice. (2) um sinal induz a reorientação, ocorrendo a exocitose de micronemas, ligando-se a parte apical do microparasita com a célula hospedeira para formar junção. (3) Róptrias são exocitadas, enquanto o movimento da junção desliza para trás e o vacúolo parasitófago começa a expandir e o material da róptria é integrado ao vacúolo da membrana. (4) O vacúolo continua expandindo e recebe lipídios da célula hospedeira e a junção atinge a extremidade posterior do parasito, vedando o vacúolo. Densos grânulos são exocitados no espaço vacuolar.



Fonte: Dubremetz et al. (1998)

A real extensão dos danos produzidos por estes microparasitos e a sua possível influência na sobrevivência nos peixes ainda é pouco conhecido, pois a maioria das publicações referem-se à descrição de espécies. No entanto, algumas espécies estudadas mostram que as lesões podem ser mais graves, podendo ser associadas com taxa de mortalidade variáveis (EIRAS, 1994).

Bonar et al. (2006), ao examinar o fígado de *Arapaima gigas* infectado por *Calyptospora* sp. observaram que não havia processo inflamatório, mas o parênquima hepático estava substituído cerca de 15 a 33% pelo microparasito, sugerindo que poderia ocasionar insuficiência hepática e mortalidade.

### 3.2.5. Coccidioses na ictiofauna brasileira

No Brasil, existem poucos estudos de coccidioses em peixes. Somente a partir do século 21 as pesquisas começaram a avançar, principalmente, as relacionadas à descrição de espécies com auxílio de microscopia eletrônica (AZEVEDO, MATOS, MATOS, 1993; 1995; CASAL et. al., 2007). As espécies de *Calyptospora* registradas estão na Quadro 2.

Quadro 3. Registros de espécies do gênero *Calyptospora* parasitando peixes no litoral brasileiro.

Espécie	Hospedeiro	Estado	Local da infecção/ Ocorrência (%)	Autores
<i>Calyptospora. tucunarensis</i>	<i>Cichla ocellaris</i>	Ceará	Fígado	Békési e Molnár (1991)
<i>C.spinosa</i>	<i>Crenicichla lepidota</i> (jacundá)	Pará	Fígado (63%) Ovário e testículos (8%)	Azevedo et al. (1993)
<i>Calyptospora</i> sp.	<i>Arapaima gigas</i>	Manaus	Parênquima do fígado	Bonar et al. (2006)
<i>C. serrasalmi</i>	<i>Serrasalmus striolatus</i>	Pará	Fígado (53%)	Casal et al. (2007)
	<i>S. rhombeus</i>	Recife	Fígado (80%)	Casal et al. (2007)
<i>Calyptospora</i> sp.	<i>Tetragonopterus chalceus</i>	Minas Gerais	Intestino (6,35)	Albuquerque e Brasil-Sato (2010)
	<i>Triportheus guentheri</i>		Fígado e Intestino (7,3%)	Albuquerque e Brasil-Sato (2010)

### 3.3. MICROSPORÍDIOS

O Filo Microsporidia Balbiani, 1882 inclui micro-organismos que apresentam caracteres específicos de eucariotas como a presença de núcleo e dos procariotas como as unidades ribossomais típicas, devido suas características moleculares pertencerem ao Reino Fungi (BRASIL; LIMA e MOURA, 1997; MATOS et al., 2003).. Formam um conjunto de mais de 1500 espécies e são relatados em diferentes áreas geográficas, através de estudos morfológicos e ultraestruturais, principalmente, como parasitos de peixes (LOM; DYKOVÁ, 1992a).

De acordo com Wittner (1999), a primeira descrição de microsporidiose foi relatada em indústrias de sericultura da França e Itália, causando uma doença no bicho da seda, a pébrina, ocasionada pelo microsporidio *Nosema bombycis*. Nos humanos alguns estudos têm relacionado microsporidiose em pacientes imunodeprimidos, principalmente os acometidos pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (BRASIL et al., 1998; AMATO; AMATO; AMATO NETO, 1999).

### 3.3.1 Posição Taxonômica

Atualmente, os microsporídios encontram-se no Reino Fungi (CAVALIER-SMITH, 1998) e segundo Lee et al. (2008) estudos filogenéticos demonstraram que os microsporídios são fungos verdadeiros relacionados aos zigomicetos.

Os microsporídios constituem um grande grupo de eucariotas unicelulares, parasitos intracelulares obrigatórios, pertencentes ao filo Microspora. Como muitos outros parasitos unicelulares, são altamente especializados e seu mecanismo de infecção é extremamente único e sofisticado, juntamente com outras adaptações à vida no interior de outras células (KEELING; FAST, 2002).

Estes micro-organismos são ultraestruturalmente simples, não apresentando mitocôndria, peroxissomos nem um aparelho de Golgi clássico (MAGALHÃES et al., 2006) e podem infectar uma variedade de tipos celulares de hospedeiros vertebrados e invertebrados (FRANZEN; MÜLLER, 1999).

Didier et al. (2004) afirmam que estão identificados cerca de 1200 espécies, sendo a maioria parasitas de animais invertebrados e peixes. Matos (2007) relata que nos peixes existem aproximadamente 156 espécies de microsporídios, distribuídos em 15 gêneros, com diferentes e complexos ciclos de vida, e que produzem, no ambiente, esporos resistentes, responsáveis pela transmissão horizontal.

Várias pesquisas envolvem a posição sistemática deste grupo (CAVALIER-SMITH, 1993;1998; VÁVRA; LARSSON, 1999), devido algumas características que apresentam como ausência de complexo de Golgi, de mitocôndrias, de lisossomos e de peroxissomas (PERKINS, 1991).

### 3.3.2. Morfologia

Os microsporídios apresentam estruturas exclusivas, portanto, específicas desse grupo como o tubo polar e o polaroplasto (MATOS et al., 2004a). As principais características dos seus esporos maduros são seu pequeno tamanho (2-7 $\mu$ m por 1,5-5 $\mu$ m), paredes espessas e aparelho de extrusão (BIGLIARDI; SACCHI, 2001).

A parede possui espessura variável e contorna um esporoplasma uni ou binucleado (MATOS; AZEVEDO, 2004b). Esta parede é formada internamente uma estrutura eletrônica

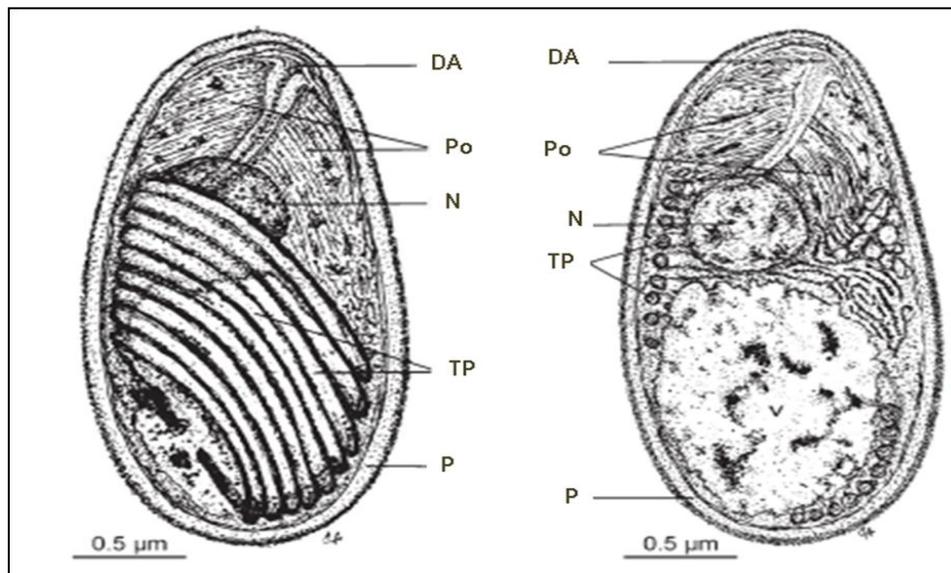
luscente, denominada de endósporo e, externamente, uma estrutura eletrônica densa, denominada de exósporo (BIGLIARDI; SACCHI, 2001).

Bigliardi e Sacchi (2001) estudaram a ultraestrutura do gênero *Encephalitozoon* e mostraram que o exósporo é formado por três camadas, uma camada exterior espinhosa, uma intermediária eletrônica luscente e uma interna fibrosa. O endósporo forma projeções que permitem o contato do exósporo com a membrana plasmática.

O aparelho de extrusão é constituído por um tubo polar e por um disco de ancoragem. O número de voltas do filamento polar é variável entre gêneros e espécies. Em condições adequadas o tubo polar projeta-se para porção posterior sob a forma de um enrolamento em espiral à volta do vacúolo, inoculando o esporoplasma na célula hospedeira (FRAZEN; MÜLLER, 1999; MATOS et al., 2003).

Segundo Matos et al. (2004a) a maioria dos esporos possui um vacúolo de volume variável na porção posterior, sendo que na maior parte dos casos é nesta porção que o tubo polar se enrola, localizando-se entre o vacúolo e a parede do esporo. O núcleo encontra-se na porção média do esporo, entre o polaroplasto e o vacúolo, sendo frequentemente rodeado por vários polirribossomas (Figura 4).

Figura 4: Desenho esquemático tridimensional do esporo do *Microsporidium brevirostris* (esquerda) e morfologia ultraestrutural em secção longitudinal (direita). DA – disco de ancoragem, N - núcleo, Po - polaroplasto, TP - tubo polar, V - vacúolo, P- parede do esporo.



Fonte: Modificado de Matos e Azevedo (2004b).

Geralmente o esporo divide-se em duas porções, uma apical que ocupa quase a totalidade do polaroplasto, sistema complexo de membrana importante no processo de

extrusão do tubo polar e uma porção basal que é ocupada geralmente por um vacúolo volumoso. Em algumas espécies, pode-se encontrar no interior deste vacúolo, o posterossoma (MATOS et al., 2003).

A maioria dos esporos possui um vacúolo de volume variável na região posterior onde o tubo polar enrola-se, permanecendo entre o vacúolo e a parede do esporo. O núcleo localiza-se, na maioria das vezes, na porção média do esporo, entre o polaroplasto e o vacúolo e, frequentemente, está circundado por vários polirribossomas, ordenados na forma de fitas (MATOS et al., 2004a).

De acordo com Casal et al. (2008) em decorrência da pequena dimensão dos esporos, o estudo dos microsporídios só obteve avanço significativo após o advento da microscopia eletrônica e dados ultraestruturais são indispensáveis para a identificação e classificação das espécies.

Algumas infecções em células hospedeiras envolvem uma completa reestruturação dela, denominadas de xenomas revelam estruturas diferentes na sua superfície, por exemplo, microvilosidades com vesículas pinocíticas em sua base e uma espessa camada de ectoplasma. Dentro do xenoma pode haver feixes de microfibrilas, algumas vezes membranas aneladas, várias vesículas ou gotículas de gordura modificadas no retículo endoplasmático, e várias estruturas tubulares que envolvem as etapas de desenvolvimento do parasita. Sua estrutura pode variar, conforme o hospedeiro e a espécie de microparasita que o está infectando (LOM; DIKOVA, 2005).

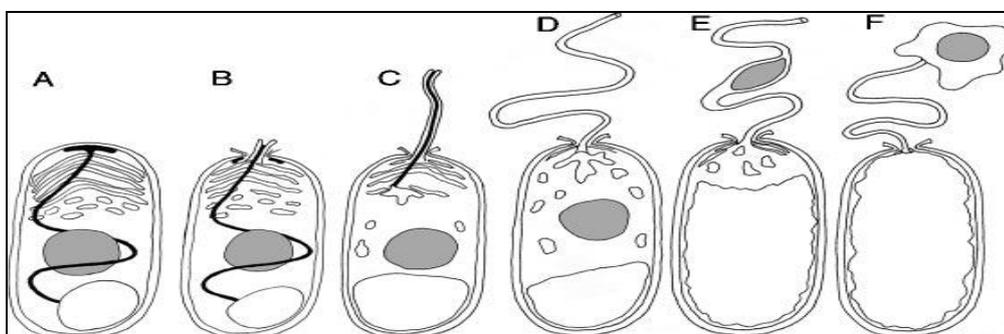
### **3.3.3. Ciclo Biológico**

Para que ocorra o ciclo de vida dos microsporídios é necessário que este microparasito penetre no corpo do hospedeiro e se reproduza nos tecidos adequados para o seu desenvolvimento. No entanto, os esporos não procuram ativamente o hospedeiro e para que ocorra a infecção devem estar presentes no ambiente, podendo ser transportados pelo vento, água e outros organismos (VAN DRIESCHE; BELLOWS, 1996).

Quando o esporo se encontra em condições favoráveis à sua “germinação”, seu tubo polar desenvolve-se e é projetado a uma longa distância. Durante esse processo, o núcleo e alguns componentes do esporoplasma são descarregados do esporo pelo tubo polar estruído. O filamento estruído, dirigido por uma grande força osmótica, é duro e sólido bastante para perfurar as células do hospedeiro, injetando seus componentes. Uma “concha” de esporo

vazia permanece para trás (Figura 5) (LOM; DYKOVÁ, 1992). Este mecanismo consiste na pressão interna do esporo e a separação das membranas esporolasmáticas, culminando na ruptura do disco de ancoragem e a descarga do filamento polar por eversão (KEELING; FAST, 2002).

Figura 5. Eversão do tubo polar durante a germinação do esporo: **(A)** Esporo dormente mostrando filamento polar (preto), núcleo (cinza), polaroplasto e vacúolo posterior. **(B)** Vacúolo posterior aumentando de volume, ruptura do disco de ancoragem e o filamento polar começa a emergir. **(C)** Filamento polar continua a everter. **(D)** Filamento polar totalmente evertido e o esporoplasto é forçado a entrar **(E)** através do tubo polar. **(F)** esporoplasma emergindo aparti do tubo polar ligado por nova membrana.

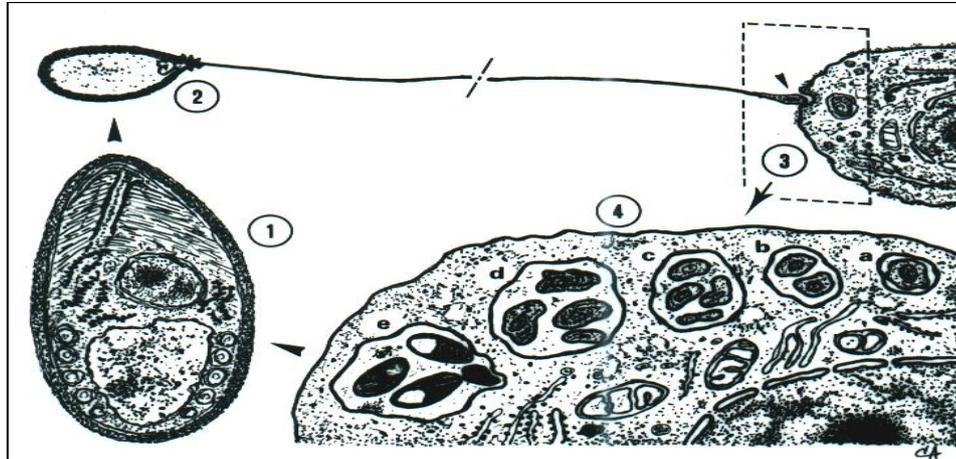


Fonte: Keeling e Fast, (2002).

Segundo Didier et al. (2004), a extrusão deste filamento polar, que inocula o esporoplasma na célula hospedeira, constitui o mecanismo primário de infecção dos microsporídios. Depois que o núcleo entra na célula hospedeira, uma pequena porção do citoplasma e da membrana regenera-se, tornando-se a fase de meronte. Estes são células geralmente arredondadas ou alongadas, que se desenvolvem no interior de um vacúolo do citoplasma da célula hospedeira (MATOS et al., 2003; 2004a).

Os merontes se dividem várias vezes por divisão binária, múltipla ou por plasmotomia, dependendo da espécie, sendo que no final desta fase de divisão (merogonia), os merontes se diferenciam em esporontes, ocorrendo outra divisão, a esporogonia. A seguir, os esporontes começam a espessar sua parede e no final desta fase, originam os esporoblastos, que são geralmente ovóides. Em seguida, os esporoblastos continuam a se diferenciar e espessar sua parede, originando assim os esporos maduros (Figura 6) (MATOS et al., 2003; 2004a).

Figura 6. Ciclo de vida de um microsporídio ilustrando a fase do esporo: (1), esporo com a extrusão do tubo polar. (2) Célula hospedeira do esporoplasma (3), diferentes fases consecutivas do ciclo de vida em célula hospedeira. (4) meronte (a, b); esporonte (c); esporoblasto (d);



Fonte: Matos et al. (2004a).

### 3.3.4. Patologia

Matthews e Matthews (1980) relataram que a transmissão dos microsporídios pode ocorrer pela ingestão de esporos na água e pela ingestão de carcaças infectadas ou da atividade predatória de exemplares infectados. Causam infecções intestinais e sistêmicas, porém a patogenia varia em função do parasita envolvido e da competência da reposta imunológica do hospedeiro (WASSON; PEPPER, 2000).

Quando o microparasito inicia o processo de proliferação na célula hospedeira, o citoplasma e as organelas começam a ser destruídas e o espaço é ocupado por esporos maduros. Havendo a formação de xenoma, a célula hospedeira sofrerá a hipertrofia celular ou destruição celular. O xenoma oferece condições de crescimento ideais para o parasito, incluindo proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro (LOM; DIKOVA, 2005).

Diková e Lom (2000) observaram que o microsporídio *Kabana arthuri* parasitando *Pangasius sutchi* provocou pontos de infecção nas fibras musculares, desorganizando o sarcoplasma. Azevedo e Matos (2003a) identificaram um novo gênero e espécie de microsporídio, *Amanzonspora hassar* em *Hassar orestis* e evidenciaram na observação ultra-estrutural o espaço do citoplasma ocupado por numerosos esporos. Essa espécie pode causar infecções crônicas nos hospedeiros, provocando uma redução da sua condição corporal.

### 3.3.5. Microsporidiose em peixes do litoral brasileiro

No litoral brasileiro, pesquisas têm descrito inúmeras espécies de microsporídios parasitando peixes (Quadro 3).

Quadro 3. Registros de microsporídio parasitando peixes capturados no litoral brasileiro.

Espécie	Hospedeiro	Estado	Local da infecção	Autores
<i>Microsporidium girardini</i>	<i>Girardinus caudimaculatus</i>	São Paulo	Pele, músculo, intestino.	Sprague, 1977, <i>apud</i> Casal, 2010
<i>Loma myrophis</i>	<i>Myrophis platyrhynchus</i>	Pará	Mucosa intestinal	Azevedo e Matos, 2002b
<i>Amazonspora hassar</i>	<i>Hassar orestis</i>	Pará	Filamento branquial	Azevedo e Matos, 2003a
<i>Microsporidium brevirostris</i>	<i>Brachyhypopomus brevirostris</i>	Pará	Musculo da cavidade abdominal	Matos e Azevedo, 2004b
<i>Potaspota morhaphis</i>	<i>Potamorhaphis guianensis</i>	Pará	Cavidade celomática	Casal et al., 2008
<i>Loma psittaca</i>	<i>Colomesus psittacus</i>	Pará	Parede intestinal	Casal et al., 2009

### 3.4. MIXOSPORÍDIOS

Mixosporídios (Myxosporea) são endoparasitas comuns encontrados nos diversos órgãos de peixes. A maioria destes parasitos é estenoxeno, infectando somente uma única espécie de hospedeiro. Entretanto, uma única espécie pode albergar dezenas de espécies de mixosporídios. Desde o fim do século dezenove, especialistas estão pesquisando o ciclo evolutivo dos mixosporídios e as doenças que eles provocam. Há quinze anos foram obtidos resultados significativos que possibilitaram explicar os processos patogênicos (BÈKESI; SZÉKEL; MOLNÁR, 2002). Este grupo de metazoários é economicamente importante, por causar doenças em uma grande variedade de peixes de interesse comercial (KAUR; SINGH, 2010a).

Os mixosporídios podem infectar peixes, mas alguns também são parasitos de répteis e anfíbios (ADRIANO et al., 2009). São relatados em diferentes áreas geográficas, através de estudos morfológicos e ultraestruturais (LOM; DYKOVÁ, 1992b).

#### 3.4.1. Posição Taxonômica

Durante muito tempo os mixosporídios foram considerados como pertencentes ao Reino Protista, mas algumas características os diferenciavam deste, como esporos multicelulares e

cápsulas polares. No entanto, foi através de estudos filogenéticos utilizando os dados do sequenciamento do gene 18S DNAr, que confirmaram a relação destes microparasitos com os metazoários (Infrafilo Metazoa) (CAVALIER-SMITH, 1998).

Atualmente, o Filo Myxozoa está dividido em duas classes: Malacosporea, esporos de valvas sem rigidez e que infectam os briozoários e os peixes; e Myxosporea, com esporos de valvas rígidas e que ocorrem em anelídeos e peixes (LOM; DIKOVÁ, 2006; CASAL et al., 2009).

### 3.4.2 Morfologia

Os mixosporídios são organismos metazoários primitivos que passam por uma fase vegetativa prolongada nos peixes onde surgem esporos apresentando no mínimo seis células. As formas vegetativas geralmente são plasmódios grandes contendo numerosos núcleos vegetativos e células germinativas (KENT et al., 2001).

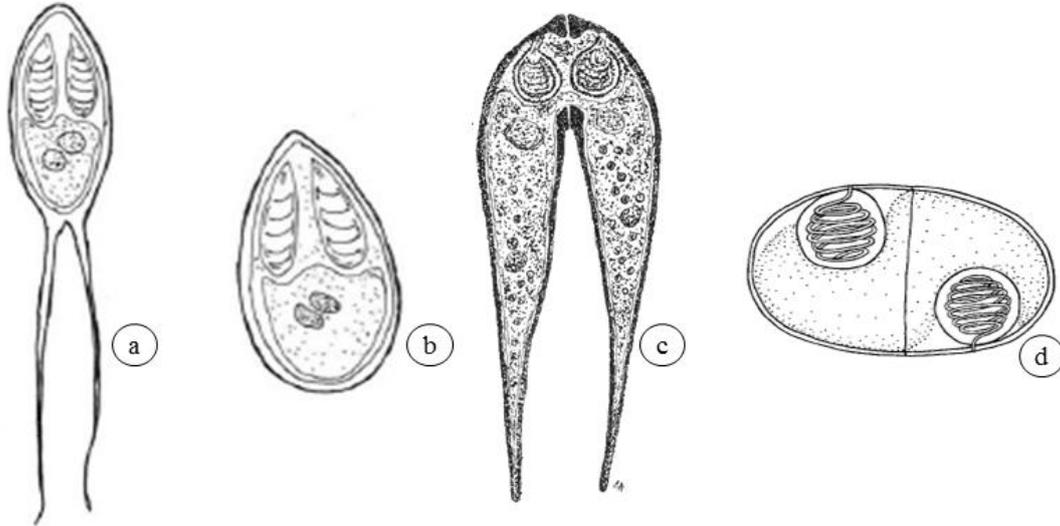
O gênero *Henneguya* Thélohan, 1892, caracteriza-se por apresentar o corpo elipsóide, duas cápsulas polares e duas valvas posicionadas paralelamente a linha de sutura que se prolongam, dando origem a duas projeções caudais, e um esporoplasma binucleado, geralmente, com forma esférica e algumas vezes inclusão de polissacarídios (Figura 7a). Parasitam principalmente peixes de água doce e possuem tropismo pelo tecido branquial (LOM; DYKOVÁ, 1992b; KENT et al., 2001; LOM; DIKOVÁ, 2006).

O gênero *Myxobolus* Bütschli 1882, o maior gênero dentro de Myxosporea pode possuir esporos elipsóides, óvoides ou arredondados, duas cápsulas polares que geralmente são piriformes e às vezes desiguais e a crista pode estender-se posteriormente a borda crescente e ao esporoplasma binucleado (Figura 7b) (EIRAS; MOLNÁR; LU, 2005; LOM; DIKOVÁ, 2006).

Outros gêneros que não são frequentemente encontrados são *Meglitschia* Kovaleva, 1988 e *Ellipsomyxa*. O *Meglitschia* que se caracteriza por esporos em forma de V, cápsulas polares alongadas dispostas quase que axialmente em cada válvula (AZEVEDO et al., 2011a) (Figura 7c).

O gênero *Ellipsomyxa* apresenta esporos alongados em direção o perpendicular ao centro e em linha reta transversal a sutura, válvula hemiesférica alongada, duas cápsulas polares esféricas iguais e distantes do plano sutural em lados opostos da superfície dos esporos, descarregando em direções opostas (Figura 7d) (KØIE, 2003).

Figura 7. Desenho esquemático de esporos de Mixosporídios: **a.** *Henneguya*, **b.** *Ellipsomyxa*, **c.** *Myxobolus*, **d.** *Meglitschia*.



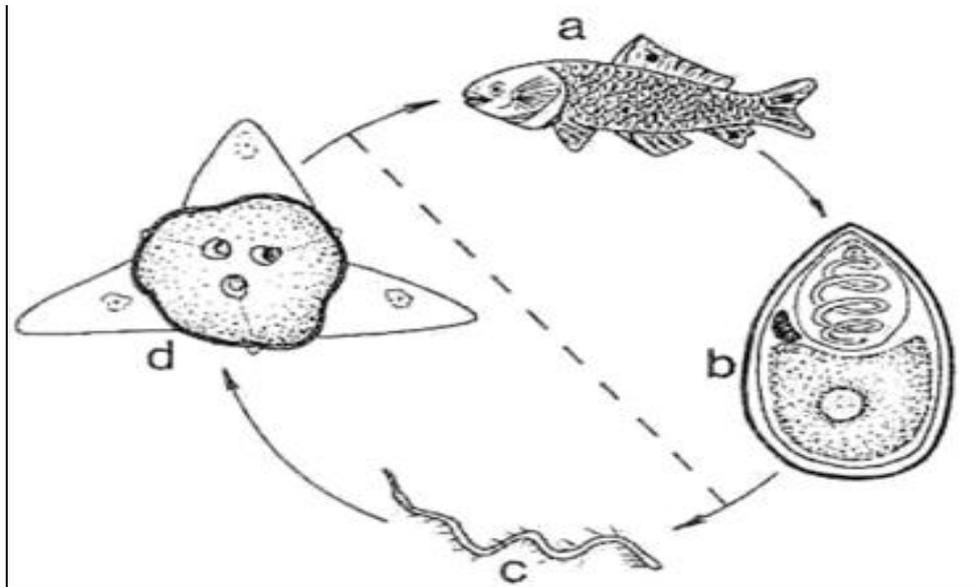
Fonte: Koie (2003), Casal (2010c); Azevedo et al. (2011a).

### 3.4.3. Ciclo Biológico

As células generativas originam os esporos de seis células, sendo dois deles destinados a formar dois hemisférios de esporoteca, outros dois para surgir duas tecas polares com o fio polar e os dois restantes para formar germes (esporoplasma) amebóides. Seu ciclo de vida necessita de dois hospedeiros um intermediário, o peixe, e um definitivo, um actinospóreo (BÉKÉSI; SZÉKELY; MOLNÁR, 2002).

A fase mais conhecida é esporal, que ocorre geralmente em peixes (hospedeiros intermediários) e a fase de actinospóreos (esporogonia) que envolve um processo sexual, nos anelídeos conforme demonstrado na Figura 8 (LOM; DIKOVÁ, 2006).

Figura 8. Ciclo evolutivo de *Myxoporeia* (a) peixe, (b) esporo eliminado pelo peixe, (c) oligoqueta infectando, (d) actinosporo eliminado.



Fonte: Békési, Székely e Molnár (2002)

Segundo Azevedo et al. (2008) na fase esporal é observada, macroscopicamente ou microscopicamente, plasmódios contendo esporos alojados no tecido hospedeiro. Os esporos maduros podem ser facilmente observados à microscopia de luz e de contraste por interferência diferencial (Nomarski - DIC), sendo que a morfologia do corpo esporal pode variar de ovóide a quadrangular.

#### 3.4.4. Patologia

Os mixosporídios são economicamente importantes, pois alguns provocam doenças específicas nos alevinos, como o rodopio dos salmonídeos. O *Myxobolus cerebralis* é um agente etiológico altamente contagioso que provoca elevadíssimas taxas de mortalidade, sendo difícil de erradicar e não existem processos terapêuticos eficazes. Por isso a doença causada por esta espécie está incluída na lista de doenças de peixes de declaração obrigatória nos países em que existe legislação sobre as mesmas (EIRAS, 1994; BÈKESI; SZÉKEL; MOLNÁR, 2002).

*M. cerebralis* localiza-se nas zonas de cartilagens que são progressivamente destruídas à medida que se dá seu desenvolvimento. Quando o desenvolvimento ocorre junto a cápsula auditiva, os danos resultam na alteração da natação e os alevinos não conseguem nadar em linha reta, apenas em círculo (EIRAS, 1994).

Azevedo et al. (2011b), examinando exemplares de *Brycon hilarii* provenientes do rio Paraguai no estado do Mato Grosso do Sul, encontraram *Myxobolus brycon* n. sp. e observaram que os filamentos branquiais apresentavam tumefação na periferia, resposta inflamatória e hipertrofia das células desta região e desorganização das organelas e citoplasma. Porém, os exemplares examinados não apresentaram sinais clínicos de doença.

Em relação ao gênero *Henneguya*, Vita et al. (2003) encontraram *Henneguya astyanax* infectando as brânquias de *Astyanax keithi*, provenientes do rio Amazonas, observando moderada hiperplasia celular no epitélio branquial e processo inflamatório mononuclear com leve infiltrado no interstício da guelra sem sinais significativos de atrofia.

Azevedo et al. (2008) avaliaram espécimens de *Gymnorhamphichthys rondoni* no rio Amazonas e identificaram *Henneguya rondoni* n. sp., parasitando o sistema nervoso periférico, com os peixes apresentando letargia e distúrbio de curta duração em seus movimentos.

#### **3.4.5. Infecção por mixosporídioses em peixes do litoral brasileiro**

Os microsporídios são economicamente importantes, por causarem doenças em uma grande variedade de peixes de valor comercial e alguns autores têm registrado espécies de *Myxobolus* (Quadro 4) e *Henneguya* no Brasil (Quadro 5).

Quadro 4. Registros das espécies do gênero *Myxobolus* parasitando peixes capturados do litoral brasileiro.

<b>Espécie de <i>Myxobolus</i></b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Estado</b>	<b>Local da infecção</b>	<b>Autores</b>
<i>Myxobolus colossomatis</i>	<i>Colossoma macropomum</i>	Pará	Tecido subcutâneo	Molnár e Békési (1993)
<i>Myxobolus braziliensis</i>	<i>Bunocephalus coracoideus</i>	Pará	Brânquias	Casal et al. (1996)
<i>Myxobolus maculatus</i>	<i>Metynnis maculatus</i>	Pará	Rim	Casal et al. (2002)
<i>Myxobolus absonus</i>	<i>Pimelodus maculatus</i>	São Paulo	Cavidade opercular	Cellere et al. (2002)
<i>Myxobolus desaequalis</i>	<i>Apteronotus albifrons</i>	Pará	Brânquias	Azevedo, Corral e Matos (2002c)
<i>Myxobolus testicularis</i>	<i>Hemiodopsis microlepis</i>	Piauí	Lúmen seminífero	Tajdari et al. (2005)
<i>Myxobolus peculiare</i>	<i>Cyphocharax nagelli</i>	São Paulo	Brânquias	Martins e Onaka (2006)
<i>Myxobolus plantanus</i>	<i>Mugil platanus</i>	Rio Grande do Sul	Baço	Eiras et al. (2007)
<i>Myxobolus heckelii</i>	<i>Centromochlus heckelii</i>	Pará	Brânquias	Azevedo et al. (2009)
<i>Myxobolus cordeiroi</i>	<i>Zungaro jahu</i>	Mato Grosso	Órgãos diversos	Adriano et al. (2009)
<i>Myxobolus metynnis</i>	<i>Metynnis argenteus</i>	Pará	Tecido subcutâneo da região orbicular	Casal et al. (2006)
<i>Myxobolus franciscoi</i>	<i>Prochilodus argenteus</i>	Minas Gerais	Tecido conjuntivo da barbatana	Eiras et al. (2010)
<i>Myxobolus sciades</i>	<i>Sciades herzbergii</i>	Piauí	Brânquias	Azevedo et al. (2010)
<i>Myxobolus brycon</i>	<i>Brycon hilarii</i>	Mato Grosso	Brânquias	Azevedo et al. (2011b)
<i>Myxobolus insignis</i>	<i>Semaprochilodus insignis</i>	Pará	Brânquias	Azevedo et al. (2012)

Quadro 5. Registros das espécies do gênero *Henneguya* encontrados em peixes capturados no litoral brasileiro.

<b>Espécie de <i>Henneguya</i></b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Estado</b>	<b>Local da infecção</b>	<b>Autores</b>
<i>Henneguya malabarica</i>	<i>Hoplias malabaricus</i>	Pará	Brânquias	Azevedo e Matos (1996)
<i>Henneguya astyanax</i>	<i>Astyanax keithi</i>	Pará	Brânquias	Vita et al. (2003)
<i>Henneguya friderici</i>	<i>Leporinus friderici</i>	Pará	Brânquia, intestino, Rim e fígado	Casal, Matos e Azevedo (2003)
<i>Henneguya pilosa</i>	<i>Serrasalmus altuvei</i>	Piauí		Azevedo e Matos (2003)
<i>Henneguya rhamdia</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	Pará	Brânquias	Matos, Tajdari e Azevedo (2005)
<i>Henneguya garavelli</i>	<i>Cyphocharax nagelli</i>	São Paulo	Brânquias	Martins e Onaka (2006)
<i>Henneguya rondoni</i>	<i>Gymnorhamphichthys rondoni</i>	Pará	Fibras nervosas periféricas	Azevedo et al. (2008)
<i>Henneguya pseudoplatystoma</i>	<u><i>Pseudoplatystoma corruscans</i></u> e <i>P. fasciatum</i>	São Paulo e Mato Grosso do Sul	Brânquias	Naldoni et al. (2009)
<i>Henneguya corruscans</i>	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	Paraná	Brânquias	Eiras, Takemoto e Pavanelli (2009)
<i>Henneguya torpedo</i>	<i>Brachyhypopomus pinnicaudatus</i>	Pará	Sistema Nervoso	Azevedo et a. (2011a)

### 3.5. EPIDEMIOLOGIA DE MICROPARASITÓSES EM PEIXES

Os microparasitos têm sido relatados em animais aquáticos e terrestres, sendo os peixes marinhos e de água doce, frequentemente infectados de diversas áreas geográficas do mundo (YOKOYAMA; LEE e BELL, 2002; ZHAO et al., 2008; U-TAYNAPUN et al., 2011; MAÍLLO-BELLÓN; MARQUES; GRACIA-ROYO, 2011). Microparasitos em peixes ocorrem em alguns estados brasileiros e em distintos ecossistemas (GIOIA; CORDEIRO; ARTIGAS, 1986; MARTINS et al., 2004; EIRAS; MOLNAR e LU, 2005, 2007; ADRIANO et al., 2009; SILVA et al., 2012).

É variável a localização das infecções por microparasitos em peixes. Molnár e Bekesi (1993) observaram *Myxobolus colossomatis* em tecido subcutâneo de *Astyanax altiparanae*, enquanto Eiras et al. (2007) encontraram *M. platanus* n. sp parasitando *Leporinus lacustres*. As brânquias e os filamentos branquiais são, por outro lado, localizações frequentes nas infecções provocadas por microparasitos; desse modo, Eiras, Takemoto e Pavanelli (2008), Azevedo et al. (2009) e Adriano et al. (2009) detectaram *Henneguya caudicula* sp n. parasitando brânquias de *Leporinus lacustres*, *H. hemiodopsis* parasitando *Hemiodopsis microlepes* e *Myxobolus salminus* parasitando *Salminus brasiliensis*, respectivamente.

Feijó et al. (2008) reportaram-se às brânquias e vesícula biliar como localizações das infecções por *Henneguya arapaima* em *Arapaima gigas*; parasitismo por *Calyptospora* sp. em *Brachyplatistoma vaillantii* e em *Cichla temensis* foi detectado no fígado conforme observado por Silva et al. (2012) e Velasco et al. (2012).

Os índices de ocorrência de microparasitos em peixes é muito variável e estão na dependência dos hospedeiros, regiões geográficas, metodologia empregada e tipos de estudos realizados. Eiras et al. (2007) e Adriano et al. (2009) registraram *Myxobolus platanus* n. sp. e *M. salminus* n. sp. parasitando, respectivamente, *Mugil platanus* e *Salminus brasiliensis*. *Henneguya caudicula* n. sp. parasitando *Leporinus lacustres* (EIRAS; TAKEMOTO e PAVANELLI, 2008) e *Henneguya* sp. parasitando nove exemplares da espécie *Pimelodus maculatus* (MARTINS et al., 2004). No entanto, poderá atingir números elevados, como o observado em *Henneguya arapaima* foi parasitando 26,1% dos exemplares de *Arapaima gigas* conforme Feijó et al. (2008); Azevedo et al. (2009) observaram o parasitismo de *H. hemeodopsis* em 64% dos exemplares de *Hemeodopsis microlepis* e Silva et al. (2012) determinaram o índice parasitário de 60% de *Calyptospora* sp. em *Brachyplatistoma vaillantii*. Por outro lado,

o parasitismo por *H. chydadea* ocorreu na totalidade dos exemplares de *Astyanax altiparanae* estudados, conforme Barrasa et al. (2003b).

O parasitismo por microparasitos envolve também peixes de elevado valor comercial. Molnár e Bekesi (1993) encontraram *Myxobollus colossomatis* no tecido subcutâneo de híbridos de *Colossoma macropomum* (tambacu); *Henneguya arapaima* foi observado no parasitismo de *Arapaima gigas* (pirarucu) (FEIJÓ et al., 2008) e Velasco et al. (2012) observaram o parasitismo de *Calyptospora* sp no fígado de *Cichla temensis* (tucunaré).

Os estudos especializados sobre microparasitos têm evidenciado a ocorrência de novas espécies nesse complexo grupo de parasitos. Uma nova espécie de mixosporídio, *Myxobollus insignis* foi descrita em *Semaprochilodus insignis* (Eiras et al., 2005).

Molnár e Békési (1993) estudando híbridos de tambacu (*Colossoma macropomum*), provenientes do estado do Ceará, encontraram no tecido subcutâneo *Myxobolus colossomatis* e Barrasa, Cordeiro e Arana (2003) pesquisando microparasitos no peixe *Astyanax altiparanae* em fazenda de cultivo no Rio das Pedras, Campinas estado de São Paulo, descreveram *Henneguya chydadea* parasitando 100% das brânquias dos exemplares avaliados.

Em Manaus, estado do Amazonas, Eiras, Molnar e Lu (2005) registraram uma nova espécie de mixosporídios o *Myxobolus insignis* em dois exemplares de três que foram examinados de *Semaprochilodus insignis*, tendo como local de infecção as brânquias.

Na Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Eiras et al. (2007) examinaram 46 espécimes de *Mugil platanus*, observando a infecção no baço por *Myxobolus platanus* n. sp. em quatro dos peixes estudados.

No Paraná, Eiras, Takemoto e Pavanelli (2008) observaram em cinco de 15 exemplares de *Leporinus lacustres* a infecção por *Henneguya caudicula* sp.n. nas brânquias.

No estado do Piauí, Azevedo et al. (2009) descreveram parasitismo nas brânquias por *Henneguya hemiodopsis* em 50 exemplares de *Hemiodopsis microlepes*.

Feijó et al. (2008) descreveram uma nova espécie de mixosporídio, *Henneguya arapaima* n. sp., em 26,1% dos exemplares de *Arapaima gigas* capturados no Rio Araguaia, estado de Goiás, infectando as brânquias e vesícula biliar do hospedeiro.

Adriano et al. (2009) examinaram 91 exemplares de *Salminus brasiliensis* oriundos do Pantanal e encontraram nos filamentos branquiais de quatro peixes o microparasito *Myxobolus salminus* sp. n.

Silva et al. (2012) estudaram trinta espécimes de *Brachyplatystoma vaillantii* desembarcados no município de Vigia de Nazaré, estado do Pará e observaram em 60% dos peixes examinados o parasitismo por *Calyptospora* sp. no fígado dos hospedeiros.

Ainda no estado do Pará, no município de Cametá, Velasco et al. (2012) examinaram 70 exemplares de *Cichla temensis* (tucunaré) e identificaram em 40% dos espécimes avaliados a infecção no fígado por *Calyptospora* sp. .

### 3.6. MICROPARASITOS E SAÚDE COLETIVA

Alguns estudos têm referenciado a ocorrência de microparasitos em humanos, principalmente as espécies dos filos Microspora e Mixospora. Os casos de microsporidioses têm sido relatados em pacientes imunossuprimidos, sendo catalogados como infecções oportunistas e emergentes. A epidemiologia de casos zoonóticos de microparasitos é pouco conhecida, mas acredita-se que as ocorrências variam com o estado imunológico do hospedeiro e com a espécie do parasito. Vale ressaltar que o escasso conhecimento a respeito da microsporidiose humana por parte dos profissionais da área de saúde e as dificuldades para o diagnóstico clínico e laboratorial impedem a realização de inquéritos epidemiológicos (MANZI; ZAPATA; JÚNIOR, 2003).

Alguns estudos fazem referência a transtornos gastrintestinais ocasionados por mixosporídios, como o relato de McClelland, Murphy e Cone (1997) que encontraram *Henneguya salmicola*, parasito comum de peixes salmonídeos, nas fezes de dois pacientes que apresentavam diarreia, mas o estudo não conseguiu confirmar se os pacientes tinham ingerido salmão, embora sugerissem a ingestão desse pescado fresco, em conserva ou congelado.

Em 1992 no Hospital Evandro Chagas, estado do Rio de Janeiro, foram coletadas amostras de fezes de 13 pacientes portadores de HIV que apresentavam diarreia crônica por um período médio de 3,5 semanas, para pesquisa de Criptosporidia e Microsporidia, seis pacientes (46,1%) apresentaram esporos de microsporídios nas fezes (BRASIL et al.,1996).

Brasil et al. (1998) descreveram a infecção pelo microsporídio *Enterocytozoon bieneusi* em uma paciente portadora do tipo 1 do HIV que apresentava um quadro de

diarreia crônica com quinze episódios de fezes líquidas por dia, náuseas, vômitos, anorexia, dor intermitente e uma perda de peso significativa de 24 Kg ao longo de um período de 6 meses. Culturas de fezes para detecção de bactérias e vírus foram negativas para três amostras consecutivas. No entanto, esporos de microsporídios foram encontrados em esfregaços finos corados pelo método de cromotropeo, posteriormente confirmados por análise ultraestrutural e PCR.

Boreham et al. (1998) encontraram em três pacientes acometidos de problemas gastrintestinais esporos de *Myxobolus plectroplites*, parasito do peixe de água doce *Plectroplite sambiguus*. Os pacientes consumiram peixes na alimentação, mas em dois deles os achados foram considerados incidentais e não relacionados aos sintomas clínicos devido à passagem dos esporos sem alteração pelo trato digestivo e por apresentarem outros patógenos entéricos.

Amato, Amato e Amato Neto (1999) associaram 60 pacientes adultos portadores de HIV e duas crianças filhas de mães também soropositivas ao parasitismo por microparasitos. Esporos de microsporídios foram achados em apenas um paciente do sexo masculino que apresentou diarreia com fezes de consistência pastosa durante um mês, além de dor abdominal e náuseas.

No Rio de Janeiro foram avaliados 40 pacientes portadores de HIV que apresentavam diarreia crônica. Cada paciente foi submetido a avaliação clínica, sendo realizados exames de fezes e biópsia do intestino para pesquisa de vírus, bactérias e parasitos. Dos indivíduos estudados 11 (27,5%) estavam infectados por microsporídios, sendo os esporos encontrados com maior frequência no exame direto das fezes do que em biópsia do intestino delgado. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a PCR permitiram a identificação de *Enterocytozoon bieneusi* (BRASIL et al., 2000).

Moncada et al. (2001) observaram mixosporídios do gênero *Myxobolus* sp., em um paciente portador do vírus HIV que apresentava diarreia crônica na cidade Bogotá, Colombia. No entanto, além desse achado outros agentes patogênicos como *Isospora belli*, *Strongyloides stercoralis* e *Hymenolepis nana* foram associados ao quadro diarréico e às infecções oportunistas da infecção por HIV.

Um estudo com 737 amostras fecais de pacientes de três hospitais nos Estados Unidos foi revelado que portadores do vírus HIV foram detectados esporos de microsporídios em 1,5% (n=11) dos indivíduos, todos com quadro diarreico (DWORKIN et al., 2007).

Gonçalves et al. (2006) sugeriram que os microsporídios são agentes zoonóticos e que a microsporidiose humana é subdiagnosticada, enfatizando a importância desta parasitose emergente e de seu diagnóstico precoce para a administração de tratamento específico. Os estudos a respeito da ocorrência de casos de transtornos gastrointestinais em pacientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida revelam a associação de microparasitos com a infecção pelo vírus HIV.

### 3.7. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

O diagnóstico de microparasitos envolve várias técnicas, podendo ser as mais simples, como esfregaço de fezes com coloração e aquelas que necessitam de tecnologias avançadas, como a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a biologia molecular, principalmente quando se suspeita de nova espécie.

A microscopia de luz é uma ferramenta fundamental no diagnóstico inicial de microparasitos, auxiliando na caracterização morfológica, identificação das espécies e fornecendo dados morfométricos que posteriormente irão ser confrontados com outros trabalhos para verificação de possíveis novas espécies (CASAL et al., 2009; ADRIANO et al., 2009; AZEVEDO et al., 2011a).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma das técnicas utilizadas para a identificação de novas espécies. De acordo com Matos et al. (2004a) esta técnica permite o conhecimento detalhado da morfologia microparasitária e de seus ciclos de vida. Além da realização da análise comparativa, a MET estabelece semelhanças e diferenças entre as espécies, que pode culminar com a descoberta de novas espécies. Esta técnica consiste na formação de imagem do espécime simultaneamente à passagem do feixe de luz através dele; a radiação empregada é a de feixe de elétrons, sendo ele refratado por meio de lentes eletrônicas, produzindo aumentos úteis de 200.000 a 400.000 vezes (GALLETI, 2003).

O emprego da técnica de MET é bastante difundido no estudo de materiais biológicos, pois permite a definição de imagens intracelulares em estudos de morfologia celular, aspectos gerais das organelas e também da interação de parasitos com as células, fornecendo assim informações sobre alterações e efeitos citopáticos ocasionados por vírus, fitoplasmas, micoplasmas, bactérias e outros organismos diminutos, impossível de visualizar na microscopia de luz (GALLETI, 2003).

Martins e Onaka (2006) estudando *Cyphocharax nagelli* capturados no reservatório do Rio Peixe em São José do Rio Pardo, estado de São Paulo, identificaram nas brânquias dos hospedeiros duas novas espécies de microparasitos, *Henneguya garavelli* e *Myxobolus peculiaris*.

Matos, Tajdari e Azevedo (2005), encontraram nova espécie de mixosporídeo, *Henneguya rhamdia*, infectando brânquia de *Rhamdia quelen* no rio Peixe Boi, estado do Pará. No rio Amazonas, Azevedo et al. (2011a), registraram uma nova espécie *Meglitschia mylei* na vesícula biliar de *Myleus rubripinnis*.

Adriano et al. (2009) fizeram a caracterização ultraestrutural com o uso desta técnica para verificar a ocorrência de uma nova espécie do gênero *Myxobolus*, parasitando os filamentos das brânquias de *Salminus brasiliensis*, capturados no Pantanal do Mato Grosso, denominando-o de *Myxobolus salminus*.

Outro método que vem contribuindo para a caracterização de novas espécies são as técnicas de análise filogenética, que eram muito utilizadas para investigar as relações entre os filis (CAVALIER-SMITH, 1993; 2004). A análise filogenética tem demonstrado ser de fundamental importância para a classificação de novas espécies, principalmente para aqueles gêneros que possuem várias espécies com características morfológicas muito semelhantes.

Diková, Fiala e Nie (2002) estudando *Carassius gibelio* na província Hubei na China, observaram o parasitismo do gênero *Myxobolus* no músculo esquelético deste peixe; para identificar a espécie realizaram a análise filogenética e concluíram que estavam diante de uma espécie nova, *Myxobolus lentis uturalis*.

Casal et al. (2008) descreveram os aspectos morfológicos, ultraestrutural e a caracterização molecular de um novo gênero e espécie de microsporídeo, *Potasporea morhaphis*, parasitando a cavidade celomática de peixe do rio Amazonas, *Potamorhaphis guianensis*

Adriano et al. (2009) também utilizaram a análise molecular para identificar uma nova espécie de mixosporídeo, *Myxobolus cordeiroi*, infectando arco branquial, serosa da cavidade do corpo, bexiga urinária e olhos do peixe *Zungaro jahu*, provenientes do Pantanal Mato Grossense.

Milani et al. (2010) fizeram uso da biologia molecular e da microscopia eletrônica de transmissão para caracterizar uma nova espécie de *Myxobolus*, *Myxobolus oliveirai*, que acomete *Brycon hilarii*, peixe oriundo do Pantanal Mato Grossense.

#### 4. CAPITULO I: OCORRÊNCIA DE MICROPARASITOS EM *Brachyplatystoma rousseauxii* e *Mugil curema* (Pisces: Teleostei) no estado do Pará, Brasil.

##### RESUMO

Microparasitos dos filos Apicomplexa, Microspora e Myxozoa foram encontradas nas espécies de peixes *Brachyplatystoma rousseauxii* e *Mugil curema* capturadas por pescadores artesanais e industriais na costa estuarina, no município de Vigia de Nazaré e Distrito de Mosqueiro, município de Belém, Estado do Pará, no período de março de 2010 a junho de 2012. Com o auxílio da microscopia de luz procedeu-se as observações em preparações a fresco. De 62 exemplares de *B. rousseauxii* 85,48% (n = 53) estavam parasitados por microparasitos dos três filos e gêneros *Calyptospora*, *Kabatana*, *Henneguya*, *Myxobolus*, *Ellipsomyxa* e *Meglishchia* com ocorrência de 58%, 9,6%, 19,3%, 20,9%, 4,8% e 8% respectivamente. Em *M. curema* dos 58 exemplares 58,6% (n=34) apresentavam-se infectados por microparasitos dos filos Microsporidia e Myxozoa e gêneros *Microsporidium*, *Myxobolus* e *Ellpsomyxa*, com índices parasitários de 5,1%, 56,8% e 10,3%, respectivamente. A ocorrência de gêneros microparasitos nos dois hospedeiros e o índice de parasitismo de alguns gêneros demonstram a necessidade de realização de estudos sobre esses filos em espécies de peixes da Região Amazônica.

Palavras-chave: *Brachyplatystoma rousseauxii*. *Mugil curema*. Apicomplexa. Microspora. Myxozoa.

## ABSTRACT

Microparasitos phyla Apicomplexa, Microspora and Myxozoa were found in fish species *Mugil curema* *Brachyplatystoma rousseauxii* and captured by artisanal and industrial fishermen on the coast estuaries in the city Vigia de Nazare and Mosqueiro District, in Belém, Pará State, in the period March 2010 to June 2012. With the aid of light microscopy proceeded to the observations in the fresh preparations. 62 specimens of *B. rousseauxii* 85.48 % (n = 53) were parasitized by microparasitos the three phyla and genera *Calyptospora*, *Kabatana*, *Henneguya*, *Myxobolus*, *Ellipsomyxa* and *Meglishchia* with occurrence of 58 %, 9.6%, 19.3 %, 20.9 % , 4.8 and 8% , respectively. In *M. curema* 58 copies of 58.6 % (n = 34) presented with infected microparasitos phyla Microsporidia and Myxozoa Microsporidium and genres, and *Myxobolus*, *Ellipsomyxa* with parasite indexes of 5.1 % , 56.8 % and 10.3 % %. The occurrence of microparasites genres in both hosts and parasitism of some genera demonstrate the need for studies of these phyla in fish species of the Amazon region.

Keywords: *Brachyplatystoma rousseauxii*. *Mugil curema*. Apicomplexa. Microspora. Myxozoa.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

Os microparasitos podem ser encontrados em vários órgãos de uma considerável variedade de peixes em diferentes áreas geográficas do mundo (THOMPSON et al., 2002; KAUR; SINGH, 2011b; KHLIFA, et al., 2012).

No Brasil estudos de ictio-parasitismo têm evidenciado a ocorrência desse grupo de parasitos principalmente dos filos Apicomplexa, Microspora e Myxozoa. em peixes do litoral (PAVANELLI; EIRAS; SARAIVA, 1998; FEIJÓ et al., 2008; AZEVEDO et al., 2009).

Alguns dos representantes desse grupo têm potencial patogênico, podendo também causar danos econômicos aos piscicultores por diminuírem a produtividade de seus criatórios. Dentre os gêneros cujas espécies são causadoras de enfermidades em peixes, encontram-se *Henneguya* e *Myxobolus*. Estima-se que o gênero *Henneguya* tenha cerca de 204 espécies e o gênero *Myxobolus* 744 (MARTINS et al., 1997; EIRAS; MOLNAR e LU, 2005; LOM; DIKOVÁ, 2006).

Estudos relacionados à ocorrência de microparasitos em peixes de importância comercial são necessários e visam contribuir para o conhecimento sobre os impactos econômicos na produção e comercialização. As espécies *Brachyplatystoma rousseauxii* e *Mugil curema* são peixes de interesse econômico, comercializados nos estados brasileiros, sendo que no Estado do Pará, segundo dados estatísticos oficiais são bastantes consumidos (IBAMA, 2007; BRASIL, 2012).

O objetivo do presente estudo foi relatar a ocorrência de microparasitos nos peixes *Brachyplatystoma rousseauxii* e *Mugil curema*, desembarcados no município de Vigia de Nazaré e no Distrito de Mosqueiro, município de Belém, Estado do Pará.

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1. MATERIAL

#### 4.2.1. Origem das amostras de peixes

Para a realização desse estudo foram escolhidos os peixes teleósteos “dourada” (*Brachyplatystoma rousseauxii* Casteunau, 1855), 62 exemplares e “pratiqueira” (*Mugil curema* Valenciennes, 1836), 58 exemplares (Figuras 9 e 10).

Figura 9. *Brachyplatystoma rousseauxii* Casteunau, 1855.



Figura 10. *Mugil curema* Valenciennes, 1836.

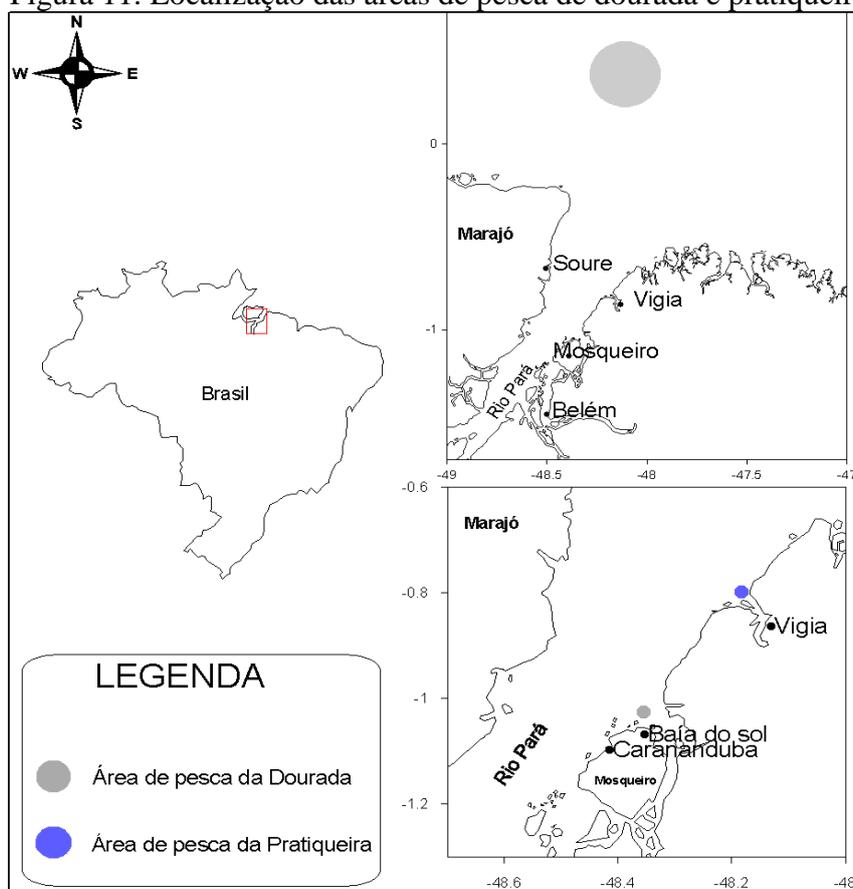


As amostras de peixes foram procedentes de indústrias pesqueiras e de pescadores artesanais do município de Vigia de Nazaré e do Distrito de Mosqueiro, município de Belém, de capturas realizadas no período de Março de 2010 a Junho de 2012 e foram colhidos de forma aleatória à chegada das embarcações pesqueiras e mensalmente. Em cada município coletou-se 31 exemplares de dourada e 29 exemplares de pratinheira.

O município de Vigia de Nazaré entre as coordenadas geográficas  $00^{\circ} 51' 12'' S$  e  $48^{\circ} 08' 41'' W$  (Figura 11), localizado na Microrregião do Salgado pertencente à Mesorregião Nordeste Paraense a uma distância de 100 Km de Belém pelas rodovias BR-316 e PA-140; a pesca é a principal atividade econômica do município.

O Distrito de Mosqueiro entre as coordenadas geográficas  $01^{\circ}9'43''S$   $48^{\circ}23'15''W$  (Figura 11), este pertence ao município de Belém, localizado na costa oriental do Rio Pará, a uma distância de 75 km de Belém pelas rodovias BR-316 e PA 391. Além do turismo, a pesca está entre as suas principais atividades econômicas.

Figura 11. Localização das áreas de pesca de dourada e pratinheira.



Fonte: Golden Software Surfer8

Os exemplares colhidos foram acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo e transportados até o Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo da Universidade Federal Rural da Amazônia (LPCA/UFRA), onde foram submetidos aos métodos recomendados para pesquisa de microparasitos.

#### 4.2.2. MÉTODOS

Com auxílio de estereomicroscópio (ZEISS) os exemplares foram examinados, iniciando-se pela superfície externa e em seguida pelos órgãos internos. Fragmentos de órgãos e cistos foram colhidos e colocados sobre lâmina com água e lamínula para observação à microscopia de luz, verificando-se elementos estruturais, como esporos pequenos com vacúolos caracterizando microsporídios, conforme trabalhos de Bigliardi, Gatti e Sacchi (1997) e Matos e Azevedo (2004), presença de cápsulas polares e projeções caudais encontradas em mixosporídios (LOM; DIKOVÁ, 2006), ou a presença de oocistos com quatro esporocistos de acordo com as descrições de Azevedo, Matos, Matos (1993; 1995) na ocorrência de coccídios.

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois hospedeiros estudados estavam infectados por microparasitos, sendo que em *B. rousseauxii* apresentou o parasitismo pelos três filis (Apicomplexa, Microspora e Myxospora) e *M. curema* apenas por dois filis (Myxospora e Microspora);

Em *B. rousseauxii* 53/62 (85,48%) exemplares apresentaram-se parasitados por *Calyptospora* sp., *Meglishchia* sp., *Myxobolus* sp., *Henneguya* sp., *Ellypsomixa* sp. ou *Kabatana* sp. (Quadro 6).

Quadro 6. Ocorrência e local de infecção de microparasitos em *Brachyplatystoma rousseauxii* capturados no Distrito de Mosqueiro e município de Vigia de Nazaré no período de março de 2010 a junho de 2012.

Filo	Microparasitas	Ocorrência (%)	Local de Infecção
Apicomplexa	<i>Calyptospora</i> sp.	58,0 (n=36)	Fígado
Microspora	<i>Kabatana</i> sp.	9,60(n=6)	Brânquia
Mixospora	<i>Henneguya</i> sp.	19,3 (n=12)	Brânquia
	<i>Ellypsomixa</i> sp.	4,80 (n=3)	Vesícula biliar
	<i>Meglishchia</i> sp.	8,09 (n= 5)	Vesícula biliar
	<i>Myxobolus</i> sp.	20,90 (n= 13)	Brânquia

A maior ocorrência parasitária foi de *Calyptospora* sp. corroborando com outras ocorrências deste gênero em peixes do litoral brasileiro. Azevedo, Matos e Matos (1993) observaram 63% de parasitismo por *Calyptospora spinosa* no fígado de *Crenicichla lepidota* capturados no Rio Amazonas e Casal et al. (2007) registraram 53% de *Calyptospora serrasalmi* no fígado de *Serrasalmus striolatus*, provenientes da mesma região.

No entanto o índice parasitário registrado para *Calyptospora* sp. no presente estudo é inferior ao referenciado por Casal et al. (2007) que observaram 80% de *Serrasalmus rhombeus* dos exemplares mostrou-se parasitado no fígado por *C. serrasalmi* e superior ao determinado por Albuquerque e Brasil-Sato (2010), 7,3%, em *Triportheus guentheri* provenientes de Minas Gerais.

A segunda maior ocorrência parasitária foi do *Myxobolus* sp. (20,9%) encontrado na dourada. Estudos como os de Azevedo, Corral e Matos (2002), Azevedo et al. (2010) e Azevedo et al. (2012) reportam taxas de parasitismo por espécies deste gênero nas brânquias de peixes, superiores aos índices obtidos na presente pesquisa,

respectivamente, 50% de *Myxobolus desaequalis* em *Apteronotus albifrons*; 60% de *Myxobolus sciades* em *Sciades herzbergii* e 46,6 % de *Myxobolus insignis* em *Semaprochilodus insignis*. Martins e Onaka (2006) observaram 5% de ocorrência de *Myxobolus peculiare*s nas brânquias de *Cyphocharax nageli*.

Com relação ao gênero *Henneguya* sua ocorrência parasitária de 19,3% em brânquias de *B. rousseauxii* situa-se próximo àquela determinada por Matos, Tajdari e Azevedo (2005), 15% de *Henneguya rhamdia* em exemplares de *Rhamdia quelen*.

O índice parasitário deste gênero no presente estudo é menor do que os encontrados por Casal, Matos e Azevedo (2003), que observaram *Henneguya friderici* em 30% de *Leporinus friderici* no Rio Amazonas; Azevedo e Matos (2003), que encontraram *Henneguya pilosa* em 30% de *Serrasalmus altuvei* oriundos de Teresina; Martins e Onaka (2006) que registraram *Henneguya garavelli* em 63,3% de *Cyphocharax nagelli* capturados em curso d'água do Reservatório do Peixe, São Paulo; Naldoni et al. (2009) que observaram *Henneguya pseudoplatystoma* nas brânquias de 36,7% de *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma fasciatum* em fazenda de criação nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Contrariamente a esses dados, Eiras, Takemoto e Pavanelli (2009) registraram apenas 3,3% de parasitismo por *Henneguya corruscans* em brânquias de *Pseudoplatystoma corruscans* provenientes do Rio Paraná.

Ocorrências de 30%, 33% e 33,3% do gênero *Henneguya* no intestino, rim e fígado de *Leporinus friderici* (CASAL; MATOS; AZEVEDO, 2003), sistema nervoso de *Brachyhypopomus pinnis caudatus* (AZEVEDO et al., 2011b) foram registradas, índices superiores ao reportado neste trabalho.

Existem poucos estudos sobre o parasitismo por *Meglishchia* sp. e *Ellypsomixa* sp. mas recentemente Azevedo et al. (2011a) registraram a ocorrência de *Meglitschia mylei* acometendo pele, brânquias, fígado, vesícula biliar, dutos intestinais, ovário, testículos e a bexiga natatória de *Myleus rubripinnis* capturados no município de Oriximiná, estado do Pará.

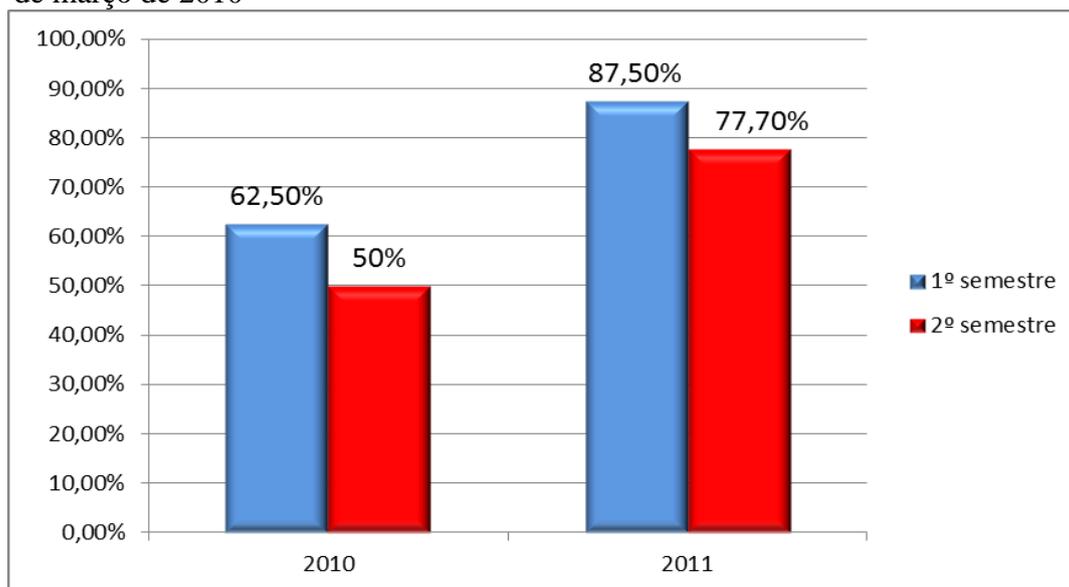
Parasitismo por espécies de *Microsporidium* na mucosa intestinal, brânquias, músculo da cavidade abdominal, cavidade celomática e parede intestinal de peixes, têm sido relatado no Brasil, como as infecções pelos microparasitos *Myrophis platyrhynch*, *Hassar oresti*, *Brachyhypopomus brevirostri*, *Potamorhaphis guianensis* e *Colomesus psittacus* nas espécies de peixes *Loma myrophis* (AZEVEDO; MATOS, 2002), *Amazonspora hassar* (AZEVEDO; MATOS, 2003), *Microsporidium brevirostris*

(MATOS; AZEVEDO, 2004), *Potasporea morhaphis* (CASAL et al., 2008), *Loma psittaca* (CASAL et al., 2009), respectivamente.

Os trabalhos de Azevedo e Matos (2003), Matos e Azevedo (2004) e Casal et al. (2008) relataram ocorrências de 37,5%, 45% e 40% de microsporídios em peixes, índices maiores do que os encontrados na presente pesquisa.

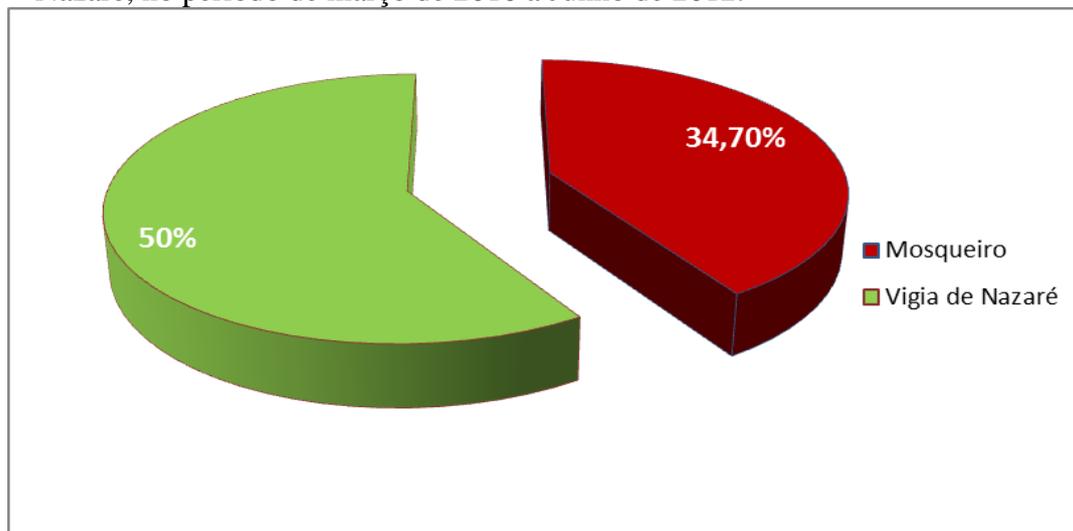
As ocorrências de microparasitos em *B. rousseauxii* foram maiores nos dois semestres do ano de 2011 com variações de cerca de 10 a 12% entre os semestres (Figura 12). A literatura científica disponível não registra dados sobre a periodicidade na ocorrência de microparasitos em peixes do litoral brasileiro, mas os dados revelam que o parasitismo ocorre em diferentes meses do ano (FEIJÓ et al., 2008; ADRIANO et al., 2009; SANTIAGO et al., 2012).

Figura 12. Percentual de ocorrência de microparasitos em *B. rousseauxii* no período de março de 2010



Os exemplares de *B. rousseauxii* colhidos no município de Vigia de Nazaré (n=31) revelaram um maior índice parasitário em relação ao Distrito de Mosqueiro (n=31) (Figura 13), considerados o mesmo período e quantidade de exemplares. Sugere-se ser essa diferença seja decorrente da salinidade e pH da água das regiões de captura, que pode ter interferido na disseminação desses grupos parasitários, ainda que esses parâmetros não tenham sido analisados no presente estudo.

Figura 13. Relação da ocorrência de parasitismos por microparasitos em *B. rousseauxii* desembarcados no Distrito de Mosqueiro e município de Vigia de Nazaré, no período de março de 2010 a Junho de 2012.



Dos 58 exemplares de *M. curema* examinados 34 (58,6%) apresentaram-se parasitados por microparasitos, identificados como pertencentes aos gêneros *Myxobolus* sp., *Ellypsomixa* sp. e *Microsporidium* sp., conforme a Quadro 7.

Quadro 7. Ocorrência e local de infecção de microparasitos em *Mugil curema*, capturados no Distrito de Mosqueiro e município de Vigia de Nazaré no período de de março de 2010 a junho de 2012.

Filo	Microparasitas	Ocorrência (%)	Local de Infecção
Microspora	<i>Microsporidium</i> sp.	5,1% (n=3)	Estômago e Bexiga urinária
Mixospora	<i>Myxobolus</i> sp.	56,8% (n=33)	Brânquia
	<i>Ellypsomixa</i> sp.	10,3% (n=6)	Vesícula biliar

A maior ocorrência foi de *Myxobolus* sp. 56,5%, que infectou brânquias, comparativamente superior aos dados informados por Azevedo, Corral e Matos (2002), Martins e Onaka (2006), Azevedo et al. (2009) e Azevedo et al. (2012) em peixes capturados no litoral brasileiro, respectivamente, 50%, 5% e 46%, porém semelhante ao assinalado por Azevedo et al. (2010), 60%.

Com índices de parasitismo menores que da presente pesquisa, 8,6%, 40%, 8,3%, 17,5% e 8,6%, respectivamente Casal, Matos e Azevedo (2002), Cellere, Cordeiro e Adriano (2002), Tajdari et al. (2005), Eiras et al. (2007) registraram o parasitismo por *Myxobolus* sp. em outros locais de infecção como o rim de *Metynniss*

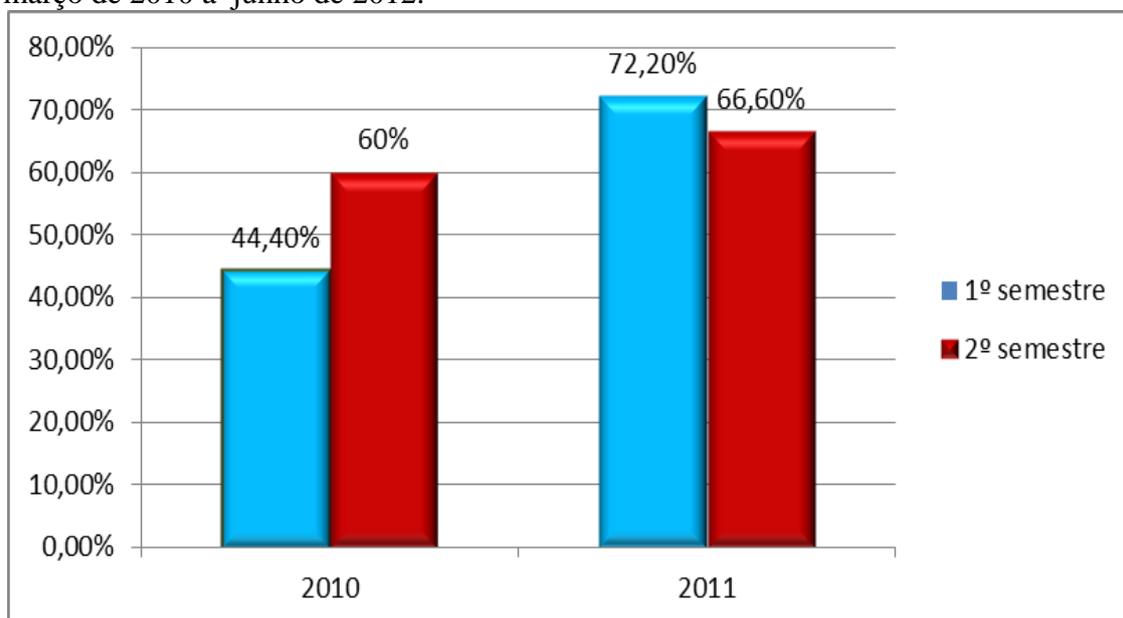
*maculatus*, cavidade opercular de *Pimelodus maculatus*, testículo de *Hemiodopsis microlepis* e baço de *Mugil plantanus*, respectivamente.

O índice de parasitismo por *Ellipsomyxa* sp., por outro lado, foi inferior aos reportados por Koie e Karlsbakk (2009) que observaram *Ellipsomyxa syngnathi* em 38% de *Syngnathus typhle* e 35% *S. rostellatus*.

A ocorrência de Microsporidia atingiu, por outro lado, índice de 5,1% (Tabela 2) muito inferior aos relatados por Matos e Azevedo (2004) e Casal et al. (2008) que encontraram 37,5%, 45% e 40%, respectivamente.

Observou-se que o parasitismo por microparasitos em *M. curema* também foi observado nos dois semestres de cada ano, com uma ocorrência maior no primeiro semestre de 2011 (Figura 14). Os exemplares colhidos no Município de Vigia de Nazaré apresentaram maior índice de ocorrência de microparasitos em *M. curema* (Figura 15). Sugere-se também que o pH e a salinidade da água dos locais de captura podem ter influenciado as proporções registradas.

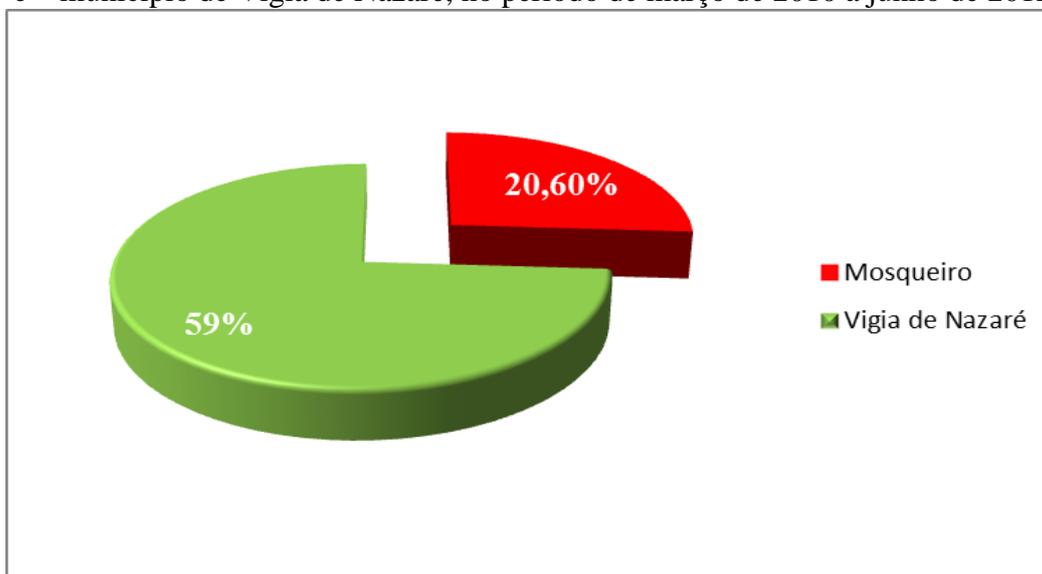
Figura 14. Percentual de ocorrência de microparasitos em *M. curema* no período de março de 2010 a junho de 2012.



Embora estudos relacionados a estes parâmetros não tenham sido referenciados, observa-se que as pesquisas realizadas por diversos autores tem registrados a ocorrência de microparasitos em diferentes regiões do mundo e com índices de ocorrências variados, conseqüentemente, os fatores sanidade e pH têm contribuído para estas variações. Eiras et al. (2010), Campos, Moraes e Moraes (2011), Azevedo et al. (2012),

embora não tenham realizados estudos relacionados com a sazonalidade, registraram o parasitismos por microparasitos em meses diferentes.

Figura 15. Relação da ocorrência de parasitismos entre o Distrito de Mosqueiro e município de Vigia de Nazaré, no período de março de 2010 a junho de 2012.



#### 4.4. CONCLUSÕES

Os resultados permitiram as seguintes conclusões:

1. As duas espécies de peixe estavam parasitadas por microparasitos, sendo Myxospora e Apicomplexa os de maior ocorrência;
2. As espécies de peixes desembarcado Município de Vigia de Nazaré estavam mais infectados;
3. O maior índice de parasitismo em *B. rousseauxii* foi de *Calyptospora* sp. (Apicomplexa), *Myxobolus* sp e *Henneguya* sp (Myxospora) e em *M. curema* foi de *Myxobolus* sp.;
4. A espécie de peixe *B. rousseauxii* mostrou-se maior susceptibilidade parasitária por Apicomplexa, Microspora e Myxospora e apresentou multiparasitismo pelo Filo Myxospora.
5. O parasitismo por *Myxobolus* sp, e *Ellypsomixa* foi comum nas duas espécies de peixes.

#### 4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, E.A.; et al.. 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. 2009.

ALBUQUERQUE, M. C.; BRASIL-SATO, M. C. First report of *Calyptospora* sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) inforage characid fish from the Três Marias Reservoir, São Francisco Basin, Brazil. **European Journal of Protistology**, v. 46, p.150-152. 2010.

AZEVEDO, C.; MATOS, P.; MATOS, E. Morphological data of *Calyptospora spinosan.* sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) Parasite of *Crenicichla lepidota* HECKEL, 1840 (Teleostei) from Amazon River. **European Journal of Protistology**, v.29, p. 171-175.1993.

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

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.; CORRAL, L.; MATOS, E. *Myxobolus desaequalis* n. sp.(Myxozoa, Myxosporea), parasite of the amazonian freshwater fish, *Apteronotus albifrons* (Teleostei, Apterontidae). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.49, n.6, p.485-488.2002.

AZEVEDO, C.; MATOS, E.. Fine structure of *Henneguya pilosas* p. n. (Myxozoa: Myxosporea), parasite of the Brazilian fish, *Serrasalmu saltuvei* (Characidae). **Folia Parasitology**, v. 50, p. 35-40.2003.

AZEVEDO, C.; et al.. Fine structure of *Henneguya hemiodopsis* sp. n.(Myxozoa), a parasite of the gills of the Brazilian teleostean fish *Hemiodopsis microlepes* (Hemiodontidae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 975–979.2009.

AZEVEDO, C.; et al. Light and electronmicroscopy 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, n.2, p.203-207, March. 2010.

AZEVEDO, C.; et al.. 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. 525–528, 2011a.

AZEVEDO, C.; et al.. *Henneguya torpedo* sp. nov.(Myxozoa), a parasite from the nervous system of the Amazonian teleost *Brachyhypopomus pinnis caudatus* (Hypopomidae). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 93, p. 235-242. 2011b.

AZEVEDO, C.; et al.. Light and Ultrastructural analysis of *Myxobolus insignis* (Myxozoa), infecting the Amazonian Fish *Semaprochilods insignis* (Prochilodontidae). **Zootaxa**, n. 3182, p. 51-56. 2012.

BIGLIARDI, E.; GATTI, S.; SACCHI, L. Ultrastructure of microsporidian spore wall: The *encephalitozoon cuniculi* exospore. *Ital. J. Zool.*, v. 6, p. 1-5. 1997.

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 monogenean and myxosporea, caught in Aquidauana River, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 67-70. 2011.

CASAL, G.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. Ultrastructural data on the spore of *Myxobolus maculatus* n. sp. (Phylum Myxozoa), parasite from the Amazonian fish *Metynniss maculatus* (Teleostei). **Diseases of Aquatic Organisms**, n.51, p. 107-112. 2002.

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

CASAL, G.; et al.. Morphological and Ultrastructural Redescription of *Calyptospora serrasalmi* (Apicomplexa: Calyptosporidae): a parasite found in two new species of the genus *Serrasalmus* and its pathological activities. **Brazilian Journal Morphology Science**, v. 20, p.11-16. 2007.

CASAL, G.; et al.. 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. 2008.

CASAL, G.; et al.. Morphological and genetical description of *Loma psittaca* sp. n. isolated from the Amazonian fish species *Colomesus psittacus*. **Parasitology Research**, v.105, n.5, p.1261-1271. 2009.

CELLERE, E. F., CORDEIRO, N. S., ADRIANO, E. A., *Myxobolus absonus* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea) parasitizing *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae), a South American fresh water fish. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 79–80. 2002.

EIRAS, J. C.; MOLNAR, K.; LU, Y.S. Synopsis of the species of *Myxobolus* Butschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). **Systematic Parasitology**, v. 61, p.1–46. 2005.

EIRAS, J. C.; et al.. *Myxobolus platanus* n. sp. (Myxosporea, Myxobolidae), a parasite of *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) from Lagoa dos Patos, RS, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n.4, p. 895-898, Belo Horizonte. 2007.

- EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. *Henneguya corruscans* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea, Myxobolidae), a parasite of *Pseudoplatystoma corruscans* (Osteichthyes, Pimelodidae) from the Paraná River, Brazil: A morphological and morphometric study. **Veterinary Parasitology**, n.159, p. 154-158. 2009.
- EIRAS, J.C.; MONTEIRO, C.M.; BRASIL-SATO, M.C. *Myxobolus franciscoisp.* nov. (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae), a parasite of *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii: Prochilodontidae) from the Upper São Francisco River, Brazil, with a revision of *Myxobolus* spp. From South America. **Zoologia**, n. 27, v. 1, p. 131-137. 2010.
- FEIJÓ, M.M.; et al.. Light and scanning electron microscopy of *Henneguya arapaima* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) and histology of infected sites in pirarucu (*Arapaima gigas*: Pisces: Arapaimidae) from the Araguaia River, Brazil, **Veterinary Parasitology**. v.157, p.59-64. 2008.
- IBAMA. Estatística da Pesca 2007: Brasil grandes regiões e unidades de Federação. 2007.
- KAUR, H.; SINGH, R. Two new species of *Myxobolus* (Myxozoa: Myxosporea: Bivalvulida) infecting an Indian major carp in Ropar and Kanjali wetlands (Punjab). **Journal of Parasitic Diseases**, v.35, n. 1, p. 23-32.2011.
- KHLIFA, S.; et al.. *Henneguya mauritaniensis* n. sp. (Myxozoa) from the arterial bulb of *Pagrus caeruleostictus* (Valenciennes, 1830) off Mauritania. **Parasitology Research**, v.111, n.3, p.1287-1294. 2012.
- KOIE, M.; KARLSBAKK, E. *Ellipsomyxa syngnathi* sp. n. (Myxozoa, Myxosporea) in the pipefish *Syngnathus typhle* and *S. rostellatus* (Teleostei, Syngnathidae) from Denmark. **Parasitology Research**. v. 105, p. 1611-1616. 2009.
- LOM J., DYKOVÁ I. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. **Folia Parasitologica**, v. 53, p. 1–36. 2006.
- MARTINS, M. L.; et al.. Pathology and behavioral effects associated with *Henneguya* sp. (Myxozoa: Myxobolidae) infections of captive pacu *Piaractus mesopotamicus* in Brazil. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 28,p. 297–300. 1997.
- MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M. *Henneguya garavelli* n. sp. and *Myxobolus peculiaries* n. sp, (Myxozoa: Myxobolidade) in the gills of *Cyphocharax nagelli* (Osteichthyes: Curimatidae) from Rio do Peixe Reservoir, São José do Rio Pardo, São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**. n. 137, p. 253-261. 2006.
- 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.; 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.

BRASIL. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. Produção Pesqueira e Aquícola: Estatística 2008 e 2009. Brasília, 2012.

NALDONI, J.; et al.. *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial área of gills in the farmed pintado, a South American catfish: Histopathology and ultrastructure. **Veterinary Parasitology**, n. 166, p. 52–59. 2009.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J.C.; SARAIVA, A. *Henneguya* spp. (Myxozoa, Myxosporidia, Myxobolidae) parasitizing fishes from Paraná river, Brazil. **Acta scientiarum**, v.20, n.2, p. 161-163. 1998.

SANTIAGO, H.; et al.. Morphology and histopathology of *Calyptospora* sp. (Apicomplexa: Calyptosporidae) in speckled peacock bass, *Cichla temensis* Humboldt, 1821 (Perciformes: Cichlidae), from the Marajó-Açu River, Marajó Island, Brazil. **Parasitology Research**, v.6, n.110, p. 2569-2572. 2012.

TAJDARI, J.; et al.. Ultrastrutura morphology of *Myxobolus testicularis* sp. n, parasite of the testis of *Hemiodopsis microlepis* (Teleostei: Hemiodontidae) from the NE of Brazil. **Acta Protozoology**, n. 44, p.377 – 384.2005.

THOMPSON, K.G.; et al.. Response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to exposure to *Myxobolus cerebralis* above and below a point source of infectivity in the upper Colorado River. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 49, p. 171-178. 2002.

VITA, P.; et al.. Ultrastructural aspects of the myxosporidian *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.

## 5. CAPÍTULO II: PARASITISMO DE *Brachyplatystoma rousseauxii* POR *Calyptospora* sp. (APICOMPLEXA: Calyptosporidae): PRIMEIRO RELATO

### RESUMO

Descreve-se a morfologia de *Calyptospora* sp. parasitando *Brachyplatystoma rousseauxii* (dourada), provenientes do município de Vigia de Nazaré e do Distrito de Mosqueiro, município de Belém, estado do Pará, Brasil. Foram examinados 62 douradas, cujos fragmentos do fígado foram submetidos as técnicas de microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e biologia molecular; 36 (58%) das amostras estavam parasitadas por um coccídio, cujos oocistos estavam distribuídos de forma irregular no parênquima hepático, agrupados ou isolados, constituídos de quatro esporocistos e oito esporozoítos com formato piriforme, caracterizando o gênero *Calyptospora*. Observaram-se no corte histológico áreas do parênquima hepático substituído por grupos deste microparasito. Este foi o primeiro registro de *Calyptospora* sp. em *Brachyplatystoma rousseauxii*.

**Palavras- chave:** Dourada. Coccídio. *Calyptospora* sp.. Fígado. Parasito.

## ABSTRACT

Describes the morphology *Calyptospora* sp. parasitizing *Brachyplatystoma rousseauxii* (catfish), from the city Vigia de Nazare and Mosqueiro District, in Belém, Pará State, Brazil. We examined 62 whose liver fragments were subjected to optical microscopy techniques, transmission electron microscopy and molecular biology, 36 (58%) of the samples were parasitized by a coccidia whose oocysts were unevenly distributed in the liver parenchyma, or grouped isolated, consisting of four sporocysts with piriformis format, featuring genre *Calyptospora*. Were observed in histological areas of hepatic parenchyma substituted by microparasite this. This was the first record *Calyptospora* sp. in *Brachyplatystoma rousseauxii*.

Keywords: Catfish. Coccidia. *Calyptospora* sp.. Liver. Parasite.

## 5.1. INTRODUÇÃO

Os protozoários do Filo Apicomplexa são parasitos obrigatórios caracterizados por possuírem um complexo apical que lhes permite penetrar na célula hospedeira (EIRAS, 1994). Esses microparasitos são frequentemente encontrados em todas as classes de hospedeiros vertebrados e invertebrados, acometendo inclusive moluscos e peixes (MATOS et al., 2004).

Dentre os representantes do Filo Apicomplexa de interesse ictiosanitário, têm-se os da subclasse Coccídia, em especial aqueles da família Calyptosporidae (DUSZYNSKI; COUCH; UPTON, 2000), sendo o gênero *Calyptospora* o principal representante. Este gênero tem sido referenciado em diversos trabalhos como causador de infecção no rim, baço, bexiga natatória, serosa e principalmente no fígado de peixes (MÓLNAR et al., 2006; SILVA et al., 2012; SANTIAGO et al., 2012).

A importância econômica de Apicomplexa em mamíferos e aves é documentada a cada ano (ALBUQUERQUE; BRASIL- SATO, 2010), mas em peixes a maioria dos trabalhos realizados descrevem apenas os aspectos morfológicos e ultraestruturais (BÉKESI; MOLNÁR, 1991; CASAL et al., 2007, SANTIAGO et al., 2012), sem estabelecer os problemas que podem acarretar nos organismos aquáticos.

Alguns autores observam na infecção por este coccídeo em peixes a substituição do parênquima hepático por grupos de oocistos de *Calyptospora* sp., sugerindo que podem causar insuficiência hepática (BONAR et al., 2006; SILVA et al., 2012). Estes achados contribuem para aumentar o interesse dos pesquisadores para os coccídios que acometem peixes do litoral brasileiro, principalmente aqueles de interesse comercial.

Em 2011 a pesca extrativa nacional produziu cerca de 800 mil toneladas de peixes com um incremento de 31% sobre o ano de 2010 e dentre as espécies comerciais de maior produção está a dourada (*B. rousseauxii*), que ocupou a quarta posição deste ano, sendo um dos recursos pesqueiros mais importantes do Baixo Amazonas e das exportações nacionais (RUFFINO; PETRERE et al., 2004; BRASIL, 2011).

Neste trabalho descreve-se as características morfológicas de *Calyptospora* sp. em *B. rousseauxii* provenientes do município de Vigia de Nazaré e Distrito de Mosqueiro, município de Belém, estado do Pará.

## **5.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.2.1 MATERIAL**

#### **5.2.1.1 Origem das amostras**

No período de março de 2010 a junho de 2012 foram necropsiados 62 exemplares de dourada, *Brachyplatystoma rousseauxii* Casteunau, 1855, provenientes de indústrias pesqueiras e de pescadores artesanais do município de Vigia de Nazaré e do Distrito de Mosqueiro, município de Belém, estado do Pará.

### **5.2.2 MÉTODOS**

Os exemplares foram capturados com o uso de apetrechos de pesca como tarrafas (pesca artesanal) e redes de emalhar (pesca industrial) e as colheitas dos exemplares foram realizadas de forma aleatória, à chegada das embarcações pesqueiras e os exemplares acondicionados em caixas de isopor contendo gelo e transportados até o Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo (LPCA/UFRA) onde foram examinados.

#### **5.2.2.1 Microscopia de luz**

Os exemplares foram examinados, com auxílio de estereomicroscópio, iniciando-se pela superfície externa e em seguida por seus órgãos internos. Pequenos fragmentos sugestivos de cistos ou lesões foram coletados e colocados sobre lâmina com água e lâminula para observação à microscopia de luz. Confirmada a presença de microparasitos, os tecidos foram fixados, corados e clarificados. A forma de coleta, fixação e clarificação baseou-se nos protocolos dos trabalhos de Behmer e Tolosa (1976) e Luna (1968).

A fixação foi feita em solução de Davidson (álcool 95%, formaldeído, ácido acético e água destilada), obedecendo à proporção de nove partes de fixador para uma de tecido, permanecendo por 24 horas, com a finalidade de impedir a ação autolítica.

Em seguida, foi feita a desidratação em concentrações crescente de álcool (70%, 80%, 90%, absoluto I, absoluto II, absoluto III), permanecendo em cada solução por uma hora. Ao término desta etapa, o material foi diafanizado, através de imersões

sucessivas em álcool/xilol (50:50) com duração de uma hora e em xilol I e xilol II pelo tempo de trinta minutos cada.

O material foi então impregnado por parafina líquida passando pelas parafinas I, II e III, em uma estufa a 60°C, obedecendo a um intervalo de meia hora em cada fase. Ao término desta etapa realizou-se a inclusão em parafina e posteriormente a microtomia (micrótomo ROTARY MICROTOME MICRON HM315) e coloração das lâminas por Hematoxilina-Eosina (HE).

A documentação fotográfica dos esporos e sua mensuração foram realizadas em um microscópio Leica DM 1000 acoplado a um computador com o software Leica Application suite versão 1.6.0 de captura de imagens. As mensurações foram realizadas de acordo com o padrão de Lom e Arthur (1989).

#### **5.2.2.2 Microscopia eletrônica**

Para a realização de microscopia eletrônica de transmissão (MET), pequenos fragmentos das regiões parasitadas foram removidos e fixados em glutaraldeído 3%, em 0,2 M de cacodilato de sódio tamponado (pH 7,2) por 3 h a 4°C. Em seguida, fez-se a lavagem com o mesmo tampão por 2-4 h a 4°C, e pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2% tamponado, por 2 horas na mesma temperatura (AZEVEDO et al., 2011).

Os materiais foram desidratados em séries crescentes de etanol e óxido de propileno, embebidos e incluídos em Epon. Para obtenção de cortes ultrafinos foi utilizado o ultramicrotomo (Leica) e os cortes ultrafinos contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. A observação foi feita em microscópio eletrônico (Zeiss EM 900), operando a 80 kV

#### **5.2.3 Técnicas moleculares**

Fragmentos do órgão contendo oocistos de *Calyptospora* sp. foram fixados em álcool etílico 80% e conservados sob refrigeração para serem submetidos aos procedimentos de biologia molecular visando a identificação de prováveis novas espécies, relacionando a posição filogenética entre espécies. A metodologia foi conduzida no Laboratório de Tecnologia Biomolecular (LTB) da Universidade Federal do Pará do Instituto de Ciências Biológicas e compreendeu as seguintes etapas:

### 5.2.3.1. Extração e Amplificação

Foram utilizadas cinco amostras para a extração do DNA utilizou-se kit NucleoSpinTissue XS (MACHEREY-NAGEL GmbH&Co.), destinado à obtenção de DNA com concentração alta, quando as amostras são pequenas. Para quantificação do produto da extração foi utilizado o espectrofotômetro (Nano 2000- Thermo Scientific) a 260nm. As análises moleculares foram baseadas no rDNA 18S e amplificadas conforme os trabalhos de Whipps et al. (2012) para coccídios.

Após a extração de DNA foi realizada a reação em cadeia de polimerase (PCR). Para a amplificação foram empregados os iniciadores Cal 1F (5'TAC ATG CGT AAA TGG ATT TGC); 18R (5'CTG GTT GAT CCT GCC AGT) e Coc2r (5'CTT TCG CAG TAG TTC GTC). O iniciador Coc2r não amplificou e devido a isto foi substituído pelo Cal 1F, objetivando fazer amplificação de aproximadamente 1500pb.

A PCR foi realizada em um termociclador (Axigem Maxygene III), constituído por 10-50 ng do DNA extraído, 1x tampão de *Taq* DNA polimerase, 0,2 mmol de dNTP, 1,5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 pmol de cada iniciador, 0,25 mL (1,25 U) de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e de água ultrapura, totalizando um volume de 25 µl.

A amplificação das amostras consistiu no uso do programa baseado nos trabalhos de Whipps et al. (2012), sendo utilizados 35 ciclos com 95°C por 3 minutos, 94°C por 30 segundos, 55° por um tempo de 45 segundos e 72°C por 1 minuto e 15 segundos e em seguida, 72°C por 7 minutos.

Após as amplificações, retirou-se 4 µl de cada produto de PCR para visualização em gel de agarose 1,5% (60 mL de TAE1X, 0,9 g de agarose). Para comparação do produto amplificado no transiluminador, utilizou-se o padrão de banda 1 Kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen®).

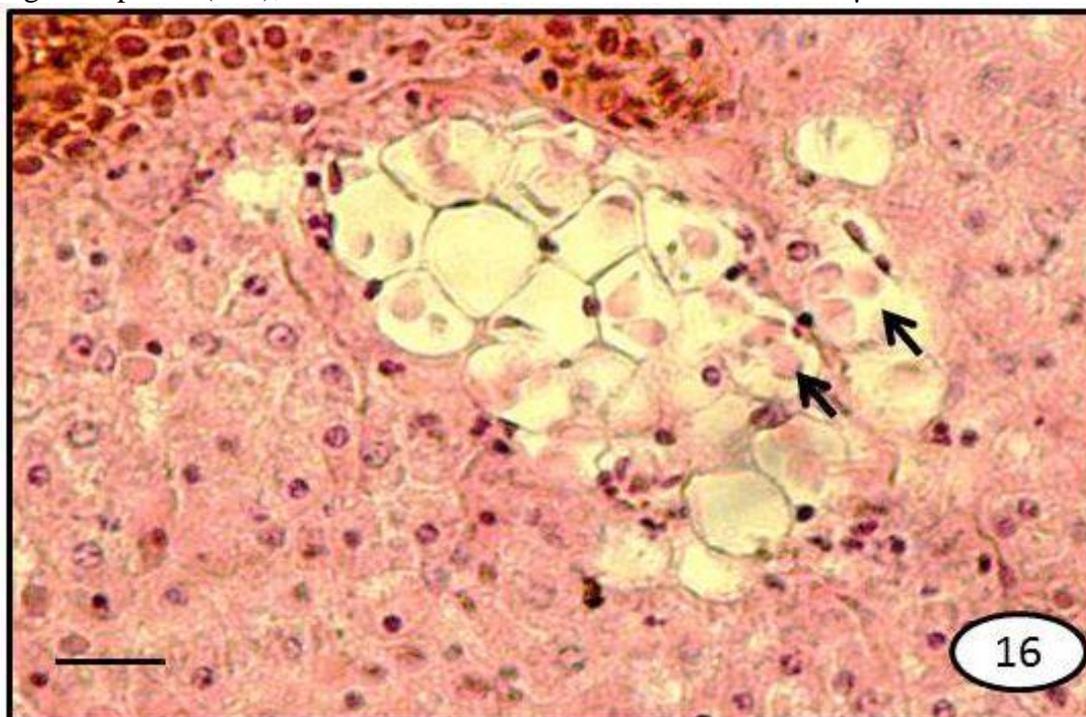
### 5.2.3.2. Sequenciamento de DNA e Análise filogenética

No sequenciamento de DNA foi utilizado analisador automático de DNA ABI 3730 com o emprego de BigDye v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems), conforme as especificações do fabricante.

### 5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

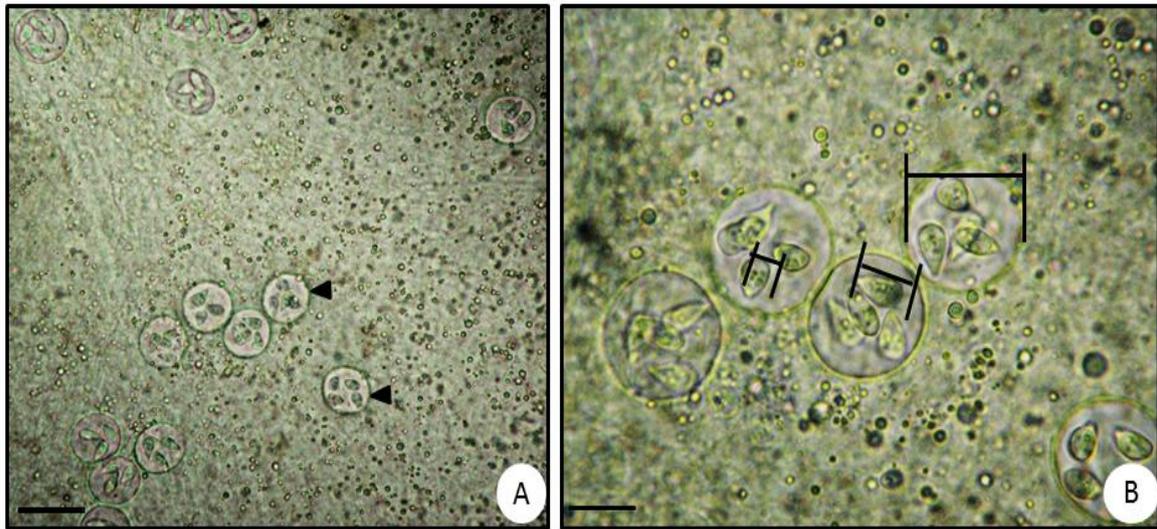
Dos exemplares examinados 58% (36/62) estavam parasitados por *Calyptospora* sp.. Observações feitas em preparações a fresco permitiram a identificação de oocistos esféricos, agrupados ou isolados, localizados no fígado. Em alguns o parênquima hepático foi substituído por grupos de *Calyptospora* sp. (Figura 16) dispostos de forma irregular. Azevedo, Matos e Matos (1993; 1995) e Silva et al. (2012) também mencionam a ocupação do parênquima hepático por grupo de oocistos de *Calyptospora* sp..

Figura 16. Corte histológico do fígado de *Brachyplatystoma rousseauxii* parasitado por *Calyptospora* sp., mostrando aglomerados de oocistos de *Calyptospora* sp. na região hepática (seta), técnica de Hamatoxilina- eosina. Escala: 25 $\mu$ m.



Na avaliação morfológica, na avaliação morfológica foram observados oocistos esféricos (Figura 17A) constituídos por quatro esporocistos com formato piriforme, evidenciando em seu interior esporozoítos, características compatíveis com o gênero *Calyptospora* de acordo com as descrições de Overstreet, Hawkins e Fournié (1984). Foram realizadas medições dos oocistos e esporocistos (Figura 17B).

Figura 17. *Brachyplatystoma rousseauxii*. Fotomicrografia de luz: **A.** Esporos de *Calyptospora* sp. (Cabeça de seta), parasitando fígado, em preparação a fresco. Bar. Esc.: 20 $\mu$ m . **B.** Oocisto de *Calyptospora* sp., mostrando as medidas dos oocistos e osporocisto. Bar. Esc.: 20 $\mu$ m.



A morformetria das principais estruturas permitiu a comparação de outras espécies deste gênero (Quadro 8).

Quadro 8. Comparação das dimensões ( $\mu\text{m}$ ) e formato dos esporos de *Calyptospora* spp., parasitando peixes teleósteo no Brasil.

Espécie	Estado	Hospedeiro	Local da infecção/ Ocorrência (%)	Formato	Diâmetro do oocisto ( $\mu\text{m}$ )	Esporocisto		Autores
						Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	
<i>Calyptospora. tucunarensis</i>	Ceará	<i>Cichla ocellaris</i>	Fígado	Frigideira, Elipsóide	23,0-26,0	7,2-9,1	3,5-5,0	Békési e Molnár (1991)
<i>C. spinosa</i>	Pará	<i>Crenicichla lepidota</i> (jacundá)	Fígado (63%) Ovário e testículos (8%)	Elipsóide	21,1-23,4	8,9-9,5	3,6-4,1	Azevedo et al. (1993)
<i>Calyptospora</i> sp.	Manaus	<i>Arapaima gigas</i>	Parênquima do fígado	Piriforme	16,0-22,0	8,0-10,0	4,5-5,0	Bonar et al. (2006)
<i>C. serrasalmi</i>	Pará	<i>Serrasalmus striolatus</i>	Fígado (53%)	Esférico	24.9-25.8	11.0-12.4	5,6-6,2	Casal et al. (2007)
<i>Calyptospora</i> sp.	Recife	<i>S. rhombeus</i>	Fígado (80%)	Elipsóide	24,5	11,5	4,5	Albuquerque e Brasil-Sato (2010)
		<i>Tetragonopterus chalceus</i>	Intestino (6,35%)					
<i>Calyptospora</i> sp.	Pará	<i>Triportheus guentheri</i>	Fígado e Intestino (7,3%)	Elipsóide	24,5	11,5	4,5	Silva et al. (2012)
		<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	Fígado (60%)	Piriforme	20,8	8,9	4,1	
<i>Calyptospora</i> sp.	Pará	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Fígado (45%)	Piriforme	28,6	11,3	6,5	Presente estudo

O diâmetro do oocisto e a largura do esporocisto, citados no presente trabalho, foram maiores que os reportados por Békési e Molnár (1991), Azevedo et al. (1993). Bonar et al. (2006), Casal et al. (2007), Albuquerque e Brasil-Sato (2010) e Silva et al. (2012). No entanto, o comprimento do esporocisto aproximou-se dos encontrados por Casal et al. (2007), Albuquerque e Brasil-Sato (2010) e foi menor do que os registrados por Békési e Molnár (1991), Azevedo et al. (1993), Bonar et al. (2006) e Silva et al. (2012). O aspecto piriforme do esporocisto encontrado neste trabalho confirma o mencionado por alguns autores (BOLNAR et al., 2006; SILVA et al., 2012).

Não foi possível visualização na MET dos componentes ultraestruturais de esporocisto e esporozoítos, como véu membranoso, esporoblasto, núcleos para caracterização de espécie (AZEVEDO; MATOS; MATOS. 1993; 1995).

Neste trabalho foram realizadas técnicas de biologia molecular, objetivando a caracterização de uma provável espécie, mas não foi possível realizar o sequenciamento, mesmo com ajustes no protocolo, pois o sequenciamento não apresentou dados consistentes, provavelmente, em decorrência da qualidade da amplificação impossibilitando a realização da análise filogenética. A maioria da literatura disponível desse gênero informa que na identificação de novas espécies, têm sido utilizados apenas os aspectos morfológicos e ultraestruturais. No entanto, técnicas moleculares começam a serem utilizadas para auxiliar na confirmação de novas espécies.

Na comparação da provável espécie em estudo com outras registradas, observa-se que o diâmetro e formato do oocisto divergiram de outros trabalhos, indicando uma espécie de *Calyptospora* parasitando o fígado *B. rousseauxii*.

#### **5.4. CONCLUSÕES**

Notifica-se uma nova espécie de peixe teleósteo amazônico como hospedeiro do microparasito *Calyptospora*.

## 5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M.C.; BRASIL-SATO, M. C. First report of *Calyptospora* sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) in forage characid fish from the Três Marias Reservoir, São Francisco Basin, Brazil. **European Journal of Protistology**, v. 46, p.150-152. 2010.

AZEVEDO, C.; MATOS, P.; MATOS, E. Morphological data of *Calyptospora spinosa* n. sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) Parasite of *Crenicichla lepidota* HECKEL, 1840(Teleostei) from Amazon River. **European Journal of Protistology**,v.29, p. 171-175. May 28. 1993.

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

AZEVEDO, C.; et al.. Light and Ultrastructural Description of *Meglitschia mylei* n. sp. (Myxozoa) from *Myleus rubripinnis* (Teleostei: Serrasalminidae) in the Amazon River System. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 58, n.6, p. 525–528. 2011.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C. **Manual de Técnicas para histologia normal e patológica**. Antonio Geraldo de Freitas Neto. São Paulo. EDART. Ed, da Universidade de São Paulo, p. 241. 1976.

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

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

CASAL, G.; et al.. Morphological and Ultrastructural Redescription of *Calyptospora serrasalmi* (Apicomplexa: Calyptosporidae): a parasite found in two new species of the genus *Serrasalmus* and its pathological activities. **Brazilian Journal Morphology Science**, v. 20, p.11-16. 2007.

DUSZYNSKI, D. W.; COUCH, L. J.;UPTON,S.J. 2000. *The coccidian genus Calyptospora* Disponível em: <<http://www.k-sate.edu/parasitology/worldcoccidia/CALYPTOSPORA?>>. Acesso em: 3 de março. 2012.

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

LANG-UNNASCH, N.; et al.. Plastids are widespread and ancient in parasites of the phylum Apicomplexa. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1743-1754.1998.

LOM, J.; ARTHUR, J. R.. A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. **Journal Fish Disease**, v.12, p.151-156. 1989.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of pathology**. Third Edition. American Registry of pathology. Edition. 1968. 258p.

BRASIL. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. Boletim estatístico da Pesca e aquicultura. Brasília, 2011.

MATOS, E.; et al.. Microrganismos Parasitos de Animais Aquáticos da Amazônia. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T., TAKEMOTO, R. M., LIZAMA, M. A. P. **Sanidade de organismos aquáticos**. Editora Varela, São Paulo, Brasil, 158-178p. 2004.

MOLNÁR, K.; et al.. Myxozoan pathogens in cultured Malaysian fishes.I. Myxozoan infections of the sutchi catfish *Pangasius hypophthalmus* in fresh water cage cultures. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.68, p. 209–218. 2006.

RUFFINO, M.L.; ISAAC, V.J. **Ciclo de vida e parâmetros biológicos de algumas espécies de peixes da Amazônia brasileira. Recursos pesqueiros do Médio Amazonas: biologia e estatística pesqueira**. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2000. 350p.

SANTIAGO, H.; et al.. Morphology and histopathology of *Calyptospora* sp. (Apicomplexa: Calyptosporidae) in speckled peacock bass, *Cichla temensis* Humboldt, 1821 (Perciformes: Cichlidae), from the Marajó-Açu River, Marajó Island, Brazil. **Parasitology Research**, v. 110, n.6, p. 2569-2572. 2012.

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

PETRETERE JR., M.; et al.. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and the stock depletion of piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). **Fish Biology and Fisheries**, v. 14, n. 4, p. 403-414.2004.

OVERSTREET, R.M.; HAWKINS, W.E.; FOURNIE, J.W. The coccidian genus *Calyptospora* n. g. and family Calyptosporidae n. fam. (Apicomplexa), with members infecting primarily fishes. **Journal Protozoology**. v. 31, p. 332-339. 1984.

WHIPPS, C. M.; et al.. Phylogeny of fish-infecting *Calyptospora* species (Apicomplexa: Eimeriorina). **Parasitology Research**, v. 111, p. 1331- 1342.2012.

## 6. CAPÍTULO III: *Kabatana* sp. (Microsporidia Balbiani, 1882): UMA NOVA ESPÉCIE PARASITÁRIA DE *Brachyplatystoma rousseauxii*

### RESUMO

No período de março de 2010 a junho de 2012 foram examinados 62 exemplares de *B. rousseauxii* capturados na costa estuarina no município de Vigia de Nazaré e Distrito de Mosqueiro, estado do Pará. Fragmentos de tecidos infectados foram processados pelas técnicas morfológica, ultraestrutural e biologia molecular, para descrição de um microparasito do filo Microsporidia. O microparasito apresentou a formação de xenoma, contendo numerosos esporos de formato elipsoidal, medindo 6,5 x 3,8  $\mu\text{m}$ . Na análise filogenética, foi possível identificá-lo como pertencente ao gênero *Kabatana*. As análises morfológicas e moleculares sugerem tratar-se de uma nova espécie desse gênero. Este é o primeiro registro de *Kabatana* sp. parasitando *B. rousseauxii* na Amazônia.

Palavras-chave: *Kabatana* sp.. Microsporidia. Ictioparasitose. *Brachyplatystoma rousseauxii*.

## ABSTRACT

From March 2010 to June 2012 were examined 62 specimens of *B. rousseauxii* captured in estuarine coast in Vigia de Nazare and Mosqueiro District, State of Pará. Fragments of infected tissues were processed by morphological techniques, ultrastructural and molecular biology to describe a microparasite the phylum Microsporidia. The microparasite presented training xenoma containing numerous spores ellipsoidal shape, measuring 6.5 x 3.8 micrometers. In phylogenetic analysis, it was possible to identify it as belonging to the genus *Kabatana*. The morphological and molecular analyzes suggest that this is a new species of this genus. This is the first record of *Kabatana* sp. parasitizing *B. rousseauxii* Amazon.

Keywords: *Kabatana* sp..Microsporidia. Ictioparasitose. *Brachyplatystoma rousseauxii*.

## 6.1. INTRODUÇÃO

Microsporídios são parasitos intracelulares obrigatórios que formam esporos e não apresentam algumas organelas como o complexo de Golgi, mitocôndrias, lisossomos e peroxissomas (PERKINGS, 1991; DIDIER et al., 2004). Microparasitos infectam uma variedade de vertebrados e invertebrados, já tendo sido descritas mais de 100 gêneros e 1000 espécies (GONÇALVES et al., 2006). Durante muito tempo, os representantes deste filo foram considerados protozoários, mas Lee et al. (2008) através de estudos filogenéticos demonstraram pertencer ao Reino Fungi.

O Filo Microsporidia vem chamando a atenção de pesquisadores de diversas áreas, por apresentarem estrutura especializada relacionada à infecção do hospedeiro, o tubo polar (XU; WEISS, 2005) e pelos registros de novas espécies parasitárias de peixes (DIKOVÁ; LOM, 2000; MATOS; AZEVEDO, 2004; CASAL et al., 2009) e, nos últimos anos, por ser a microsporidiose considerada uma doença humana oportunista emergente (MANZI; ZAPATA e JÚNIOR, 2003).

Nos humanos, a infecção por este parasito foi observada em pacientes imunossuprimidos, principalmente nos portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) que apresentam como principal sintoma a diarreia (WASSON; PEPER, 2000; DIDIER; WEISS 2006). Além disso, os relatos de microsporídioses humanas vêm ocorrendo em diversos países, como Brasil, Estados Unidos e Uganda (GONÇALVES et al., 2006; DWORKIN et al., 2007; MOR et al., 2009).

Nos peixes infectados, os microsporídios podem causar degradação do citoplasma e morte da célula ou induzir a hipertrofia da célula hospedeira, podendo ocorrer à reestruturação da célula hipertrófica, formando o xenoma, uma estrutura que proporcionará condições favoráveis ao desenvolvimento do microparasito (LOM; NILSEN, 2003; LOM; DIKOVÁ, 2005).

*B. rousseauxii* pertence ao grupo dos bagres mais comercializados na Amazônia e no país (BARTHEM; GOULDING, 1997; BRASIL, 2011). Ao longo dos anos sua produção nacional vem apresentado crescimento, sendo o Estado do Pará um dos principais produtores desta espécie (IBAMA, 2007; BRASIL, 2011).

O desenvolvimento de pesquisas relacionadas às parasitoses em peixes de valor comercial tornam-se importante, principalmente se o parasito ocasionar impactos na produção aquícola e problemas de Saúde Pública. Neste contexto, objetivou-se descrever

as características morfológicas e moleculares de um microsporídeo que parasita *B. rousseauxii* na Amazônia Oriental.

## **6.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.2.1. MATERIAL**

#### **6.2.1.1. Origem das amostras**

No período de março de 2010 a junho de 2012 foram necropsiados 62 exemplares de dourada, *Brachyplatystoma rousseauxii* Casteunau, 1855, provenientes de indústrias pesqueiras e de pescadores artesanais do município de Vigia de Nazaré e do Distrito de Mosqueiro, município de Belém, estado do Pará.

### **6.2.2 MÉTODOS**

Os exemplares foram capturados com o uso de apetrechos de pesca como tarrafas (pesca artesanal) e redes de emalhar (pesca industrial) e as colheitas dos exemplares foram realizadas de forma aleatória, à chegada das embarcações pesqueiras e os exemplares acondicionados em caixas de isopor contendo gelo e transportados até o Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo (LPCA/UFRA) onde foram examinados.

#### **6.2.2.1 Microscopia de luz**

Os exemplares foram examinados, com auxílio de estereomicroscópio, iniciando-se pela superfície externa e em seguida por seus órgãos internos. Pequenos fragmentos sugestivos de cistos ou lesões foram coletadas e colocados sobre lâmina com água e lâmínula para observação à microscopia de luz. Confirmada a presença de microparasitos, os tecidos foram fixados, corados e clarificados. A forma de coleta, fixação e clarificação baseou-se nos protocolos dos trabalhos de Behmer e Tolosa (1976) e Luna (1968).

A fixação foi feita em solução de Davidson (álcool 95%, formaldeído, ácido acético e água destilada), obedecendo à proporção de nove partes de fixador para uma de tecido, permanecendo por 24 horas, com a finalidade de impedir a ação autolítica.

Em seguida, foi feita a desidratação em concentrações crescente de álcool (70%, 80%, 90%, absoluto I, absoluto II, absoluto III), permanecendo em cada solução por uma hora. Ao término desta etapa, o material foi diafanizado, através de imersões sucessivas em

álcool/xilol (50:50) com duração de uma hora e em xilol I e xilol II pelo tempo de trinta minutos cada.

O material foi então impregnado por parafina líquida passando pelas parafinas I, II e III, em uma estufa a 60°C, obedecendo a um intervalo de meia hora em cada fase. Ao término desta etapa realizou-se a inclusão em parafina e posteriormente a microtomia (micrótomo ROTARY MICROTOME MICRON HM315) e coloração das lâminas por Hematoxilina-Eosina (HE).

A documentação fotográfica dos esporos e sua mensuração foram realizadas em um microscópio Leica DM 1000 acoplado a um computador com o software Leica Application suite versão 1.6.0 de captura de imagens. As mensurações foram realizadas de acordo com o padrão de Lom e Arthur (1989).

#### **6.2.2.2 Microscopia eletrônica**

Para a realização de microscopia eletrônica de transmissão (MET), pequenos fragmentos das regiões parasitadas foram removidos e fixados em glutaraldeído 3%, em 0,2 M de cacodilato de sódio tamponado (pH 7.2) por 3 h a 4°C. Em seguida, fez-se a lavagem com o mesmo tampão por 2-4 h a 4°C, e pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2% tamponado, por 2 horas na mesma temperatura (AZEVEDO et al., 2011).

Os materiais foram desidratados em séries crescentes de etanol e óxido de propileno, embebidos e incluídos em Epon. Para obtenção de cortes ultrafinos foi utilizado o ultramicrótomo (Leica) e os cortes ultrafinos contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. A observação foi feita em microscópio eletrônico (Zeiss EM 900), operando a 80 kV

#### **6.2.3 Técnicas moleculares**

Fragmentos do órgão contendo oocistos de *Calyptospora* sp. foram fixados em álcool etílico 80% e conservados sob refrigeração para serem submetidos aos procedimentos de biologia molecular visando a identificação de prováveis novas espécies, relacionando a posição filogenética entre espécies. A metodologia foi conduzida no Laboratório de Tecnologia Biomolecular (LTB) da Universidade Federal do Pará do Instituto de Ciências Biológicas e compreendeu as seguintes etapas:

### 6.2.3.1. Extração e Amplificação

Para a extração do DNA utilizou-se o kit NucleoSpinTissue XS (MACHEREY-NAGEL GmbH&Co.). Após extração, a qualidade do conteúdo de DNA foram determinados utilizando gel de agarose 1,5% e o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) a 260 nm, respectivamente.

A análise molecular foi baseada no rDNA 18S e ITS (Espaçadores Transcritos Interno) amplificadas conforme os trabalhos de Casal et al. (2008) e Casal et al. (2009). Para a amplificação dos genes, iniciadores específicos foram utilizados, conforme a Quadro 9.

**Quadro 9. Iniciadores utilizados para amplificação do gene 18S Rdna e o ITS.**

Iniciadores	Sequências	Referência
V1f (senso)	5'CACCAGGTTGATTCTGCC3'	Vossbrinck et al. (1993)
1492r (anti-senso)	5' GGTTACCTTGTTACGACTT3'	Vossbrinck et al. (1993)
HG4F (senso)	5'GCGGCTTAATTTGACTCAAC3'	Gatehouse e Malone (1998)
HG4R (anti-senso)	5'TCTCCTTGGTCCGTGTTTCAA3'	Gatehouse e Malone (1998)

A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada num volume final de 25 µl, o qual continha 10-50 ng do DNA, 1x tampão de *Taq* DNA polimerase, 0,2 mmol de dNTP, 1,5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 pmol de cada iniciador e 0,25 mL (1,25 U) de *Taq* ADN polimerase (Invitrogen).

O perfil de amplificação consistiu de 35 ciclos compostos de desnaturação a 95°C por 5 minutos, o anelamento a 56° por um tempo de 60 segundos e extensão a temperatura de 72°C por 90 segundos, sendo estes precedidos por um passo inicial de 2 minutos a 95°C e 5 minutos a 72°C.

Após as amplificações, retirou-se 4 µl de PCR para visualização em gel de agarose 1,5%. Para comparação do produto amplificado no transiluminador, utilizou-se o padrão de banda *1Kbplus DNA ladder in vitro*gen®.

### 6.2.3.2. Purificação e clonagem do PCR

Os produtos de PCR foram purificados com o Kit (GFX PCR DNA and Gel Band Purification foram clonados na PCR ®) vetores 4-TOPO do TOPO-TA Cloning ® kit

(Invitrogen) para sequenciamento e a bactéria utilizada para clonagem foi *Escherichia coli* JM 109.

#### 6.2.3.3. Sequenciamento de DNA e Análise filogenética

O produto da PCR utilizado para o sequenciamento foi purificado, devido o procedimento da clonagem não ter obtido resultados. No sequenciamento de DNA foi utilizado analisador automático de DNA ABI 3730 com o emprego de BigDye v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems), conforme as especificações do fabricante. As sequências de DNA foram montadas e editadas com auxílio do programa BioEdit (HALL, 2007).

Para avaliar a relação de novas espécies de outros Microsporidia foi realizada uma busca de homologia utilizando o software Blast. Vinte e seis sequências de rDNA 18S e ITS pertencentes a Microsporidia que tinham peixes como hospedeiros foram utilizadas (Quadro 10). As análises filogenéticas foram realizadas com 1000 replicas de *bootstrap*, utilizando-se o método de *Neighbor-Joining* (NJ) (SAITOU; NEI, 1997), implementado no software MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011).

Quadro 10. Número de acesso do *Genbank* das sequências de 18S rDNA de 26 microsporídios parasitos de espécie de peixes utilizado para análise filogenética.

<b>Espécie de Microsporidio</b>	<b>Número do NCI</b>
<i>Glugea americanus</i>	AF056014
<i>Glugea anomala</i>	AF044391
<i>Glugea atherinae</i>	U15987
<i>Heterosporis anguillarum</i>	AF387331
<i>Heterosporis</i> sp.	AF356225
<i>Ichthyosporidium</i> sp.	L39110
<i>Kabatana</i> sp.	FJ84310
<i>Kabatana takedai</i>	AF356222
<i>Kabatana</i> sp. JS-2012	JQ062989
<i>Loma salmonae</i>	U78736
<i>Loma embiotocia</i>	AF320310
<i>Loma</i> sp.	AF104081
<i>Microsporidia</i> sp. CHW-2012	JQ268567
<i>Microsporidia</i> sp. RW-2009a	GQ258752
<i>Microsporidium</i> sp.	AY140647
<i>Microsporidia</i> sp. GC-2010	GQ868443
<i>Microgemma caulleryi</i>	AY033054
<i>Potaspora morhaphis</i>	EU534408
<i>Pleistophora ehrenbaumi</i>	AF044392
<i>Pleistophora typicalis</i>	AF044387
<i>Pleistophora finisterrensis</i>	AF044393
<i>Spraguea lophii</i>	AF056013
<i>Spraguea</i> sp. Sdu-2008	AB623034
<i>Spraguea</i> sp. MB2010	JQ820238
<i>Tetramicra brevifilum</i>	AF364303
<i>Vairimorpha necatrix</i>	Y00266

### 6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

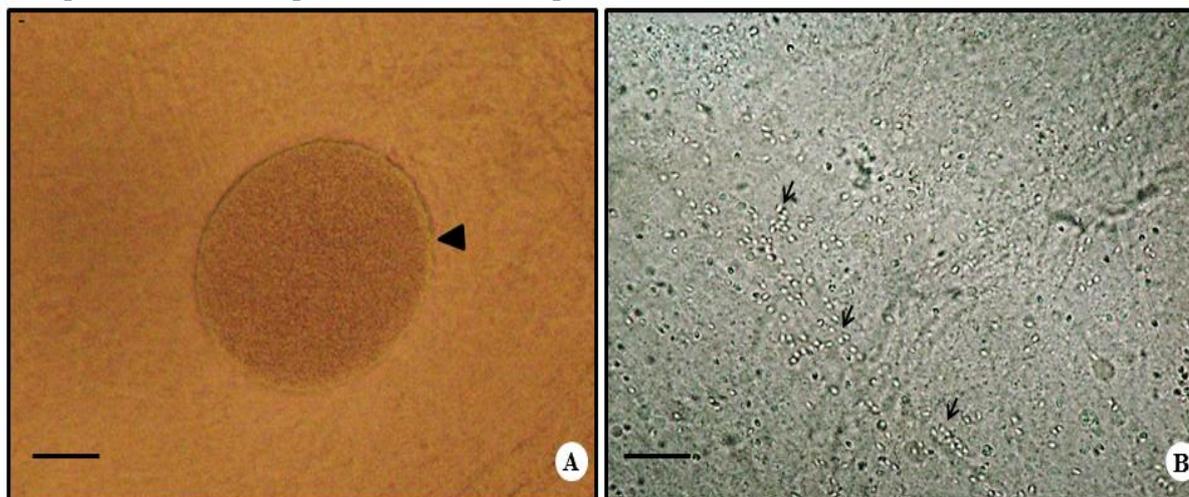
#### 6.3.1. ANÁLISES MORFOLÓGICAS

Em 6/62 (9,6%) dos exemplares de *Brachyplatystoma rousseauxii* examinados foram encontrados microsporídios, observando-se em preparações a fresco xenomas localizados nos filamentos branquiais do hospedeiro que após sua ruptura continham numerosos esporos de microsporídios (Figura 18A e B).

A presença de xenoma também foi descrita por Azevedo e Matos (2003) na necropsia de *Hassar orestis* proveniente do Rio Amazonas, quando encontraram *Amazonspora hassar* parasitando o filamento branquial do referido hospedeiro; e por Casal et al. (2008) que encontraram *Potaspota morhaphis* infectando a cavidade celomática de *Potamorhaphis guianensis*.

As microsporidioses registradas em peixes identificaram a infecção em diversos tecidos e/ou órgãos, como no intestino (AZEVEDO; MATOS, 2002), brânquias (AZEVEDO; MATOS, 2003), musculatura esquelética da cavidade abdominal (MATOS; AZEVEDO, 2004), tecido nervoso (FREEMAN; YOKOYAMA; OGAWA, 2004) e mucosa intestinal (MLADINEO; LOVY, 2011).

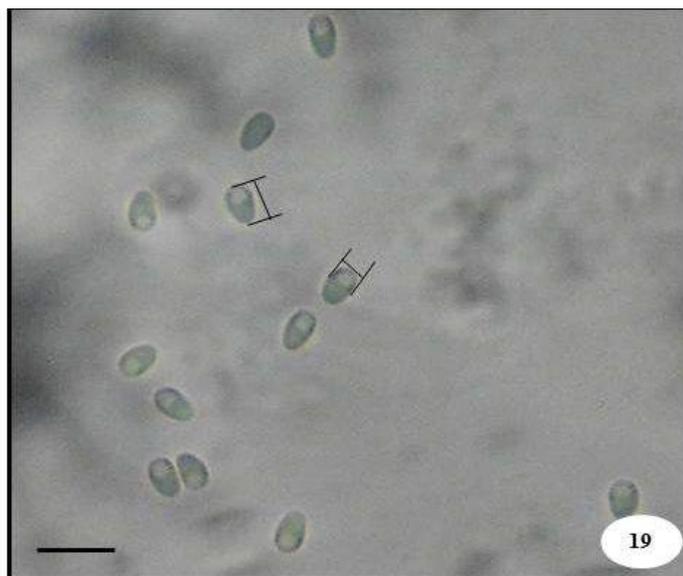
Figura 18. Exame a fresco dos filamentos brânquiais de *Brachyplatystoma rousseauxii*. Fotomicrografia de luz: A. Xenoma de *Kabatana* sp. (Cabeça de seta), parasitando brânquia, X 400. B. Esporos de *Kabatana* sp. (seta) X 400.



Os esporos apresentavam o formato elipsoidal e extremidades arredondadas, e medidas de 6,5 x 3,8  $\mu\text{m}$  (Figura 19). As dimensões dos esporos podem variar conforme a

espécie encontrada, Casal et al. (2008) descreveram microsporídio com tamanho  $2,8 \pm 0,3 \times 1,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ , Casal et al. (2009) registraram uma nova espécie com dimensões  $4,2 \times 2,8 \mu\text{m}$  e Silva (2011) encontrou *Microsporidium* sp. medindo  $4,2 \times 2,1 \mu\text{m}$ , valores menores do verificado no presente estudo.

Figura 19. Exame a fresco dos filamentos brânquiais d *Brachyplatystoma rousseauxii*. Fotomicrografia de luz: Esporo de *Kabatana* sp. mostrando medidas. Bar. Esc.: 10 $\mu\text{m}$



### 6.3.2. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

As sequências ITS foram utilizadas para construção da filogenia (Figura 20). O microparasito em estudo, *Kabatana* sp., pertence a um grupo monofilético, onde agrupa-se com três outros táxons de *Kabatana* em um clado sustentado por *bootstrap* de 55 e mais especificamente, com *bootstrap* de 62, com *Kabatana* sp. GC -2009a (FJ843105). A distância *p* (Tabela 1) indicou distância entre as espécie comparadas.

A filogenia permitiu inferir que o microsporídio pertence ao gênero *Kabatana*. A escassez de sequências de espécies do gênero *Kabatana* no banco de dados *GenBank*, pode ter dificultado a identificação do organismo analisado a nível de espécie. Contudo, novas espécies de microsporídios têm sido registradas em peixes do Rio Amazonas, como *Loma myrophis* (AZEVEDO; MATOS, 2002), *Amazonspora hassar* (AZEVEDO; MATOS, 2003), *Microsporidium brevirostris* (MATOS; AZEVEDO, 2004), *Potaspora morhaphis* (CASAL et al., 2008), *Kabatana rondoni* (CASAL et al., 2010). No entanto, somente as

duas últimas espécies basearam-se na caracterização molecular. Os outros estudos abordaram as características morfométricas e ultraestruturais.

Figura 20. Árvore filogenética de *Neighbor-Joining* (NJ) com evolução mínima (EM) e máxima parcimônia (MP), mostrando a relação de *Kabatana* sp. e outros microsporídios com base na sequência parciais de rDNA 18S. Número de acesso do *GenBank* são identificados, após o nome da espécie. Os números acima dos nós indicam os níveis de confiança de *bootstrap* NJ, EM e MP, respectivamente.

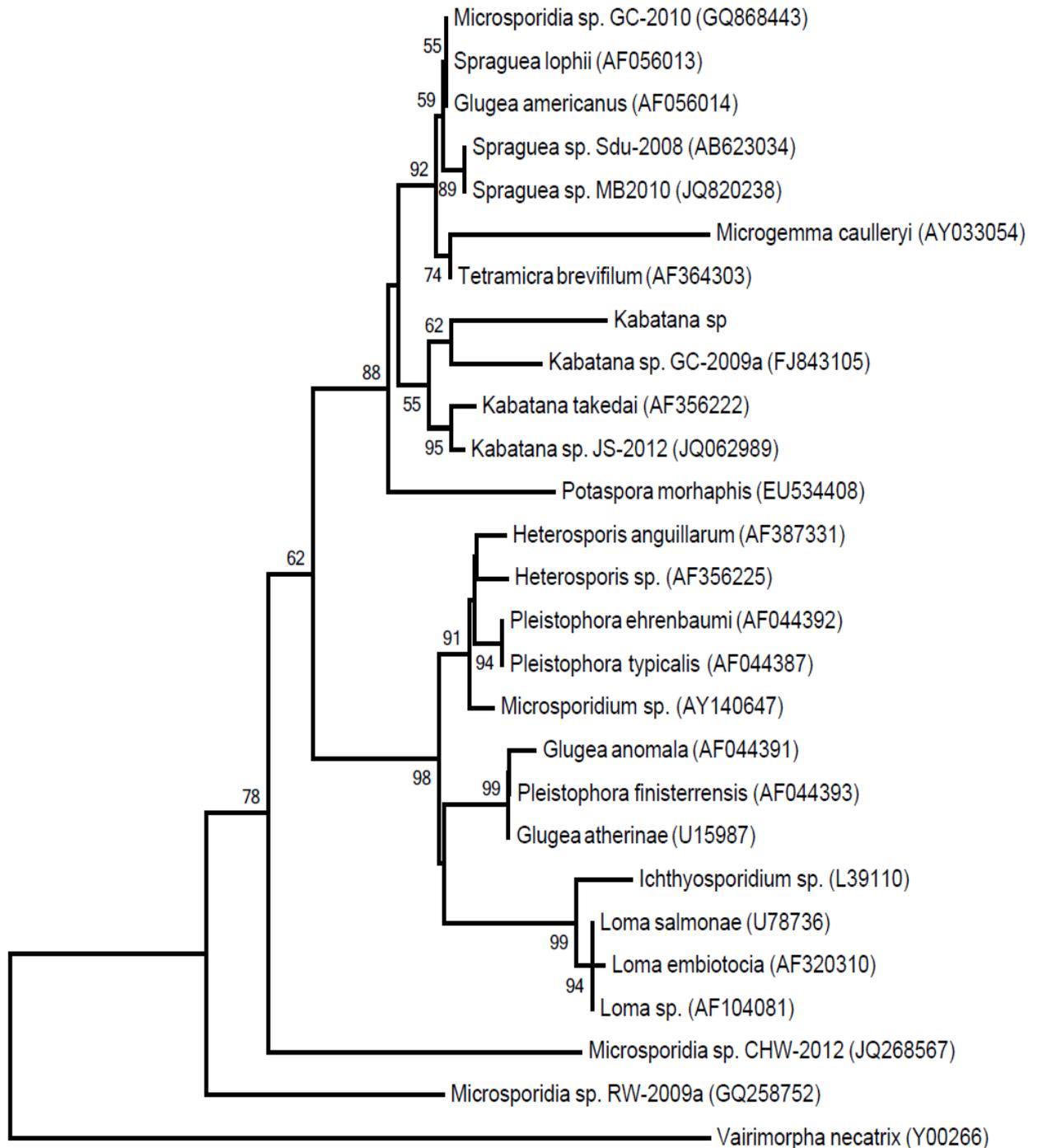


Tabela 1. Distância  $p$  das amostras analisadas e das sequências disponíveis no *Genbank* para região 18S.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)
(1) <i>Kabatana</i> sp.													
(2) <i>Glugea americanos</i>	0.0978												
(3) <i>Kabatana taketay</i>	0.1059	0.0734											
(4) <i>Kabatana</i> sp. CG 2009a	0.0856	0.0718	0.0911										
(5) <i>Kabatana</i> sp. JS- 2012	0.1048	0.0675	0.0377	0.0851									
(6) <i>Microsporidia</i> sp. RW-2009a	0.1609	0.1651	0.1820	0.1574	0.1884								
(7) <i>Microsporidia</i> sp. GC-2010	0.1097	0.0167	0.0910	0.0885	0.0850	0.1776							
(8) <i>Microsporidia</i> sp. CHW-2012	0.1691	0.1435	0.1718	0.1648	0.1775	0.1863	0.1601						
(9) <i>Potasporea morhaphis</i>	0.1402	0.0833	0.1185	0.1049	0.1198	0.1889	0.1000	0.1690					
(10) <i>Spraguea lophii</i>	0.0978	0.0048	0.0683	0.0719	0.0625	0.1651	0.0214	0.1387	0.0833				
(11) <i>Spraguea</i> sp. SDU-2008	0.1049	0.0143	0.0785	0.0766	0.0750	0.1651	0.0310	0.1507	0.0905	0.0167			
(12) <i>Spraguea</i> sp. MB 2010	0.1140	0.0218	0.0785	0.0852	0.0750	0.1755	0.0388	0.1483	0.0993	0.0242	0.0073		
(13) <i>Glugea anomala</i>	0.1798	0.1462	0.1648	0.1538	0.1760	0.1792	0.1630	0.1823	0.1845	0.1438	0.1510	0.1560	
(14) <i>GlugeaAtherinae</i>	0.1807	0.1458	0.1649	0.1535	0.1709	0.1769	0.1634	0.1759	0.1833	0.1433	0.1508	0.1508	0.0124
(15) <i>Heterosporis angillarum</i>	0.1679	0.1272	0.1574	0.1467	0.1660	0.1963	0.1440	0.1803	0.1536	0.1273	0.1296	0.1391	0.0717
(16) <i>Heterosporis</i> sp.	0.1964	0.1496	0.1689	0.1689	0.1606	0.2079	0.1690	0.2107	0.1799	0.1497	0.1524	0.1527	0.0748
(17) <i>Ichthyosporidium</i> sp.	0.2216	0.1880	0.2083	0.1931	0.2141	0.2331	0.1976	0.2077	0.2206	0.1880	0.1928	0.1910	0.1466
(18) <i>Loma embiotocia</i>	0.2071	0.1695	0.1991	0.1790	0.2022	0.2226	0.1814	0.2025	0.1930	0.1694	0.1790	0.1893	0.1216
(19) <i>Loma salmonae</i>	0.2047	0.1671	0.1965	0.1766	0.1996	0.2149	0.1790	0.2000	0.1906	0.1671	0.1767	0.1869	0.1168
(20) <i>Loma</i> sp.	0.2246	0.1848	0.1967	0.1924	0.1919	0.2277	0.1974	0.2072	0.2072	0.1848	0.1925	0.1926	0.1164
(21) <i>Microgemma caulleryi</i>	0.1921	0.1090	0.1427	0.1690	0.1424	0.2064	0.1090	0.2351	0.1682	0.1057	0.1094	0.1093	0.2251
(22) <i>Microsporidium</i> sp.	0.1687	0.1256	0.1555	0.1472	0.1668	0.1959	0.1400	0.1737	0.1614	0.1232	0.1303	0.1399	0.0670
(23) <i>Pleistophora ehrenbaumi</i>	0.1748	0.1319	0.1622	0.1414	0.1784	0.1895	0.1487	0.1655	0.1701	0.1295	0.1366	0.1414	0.0811
(24) <i>Pleistophora finisterrensis</i>	0.1696	0.1362	0.1643	0.1437	0.1755	0.1664	0.1506	0.1723	0.1720	0.1338	0.1410	0.1507	0.0168
(25) <i>Pleistophora typicalis</i>	0.1745	0.1340	0.1644	0.1436	0.1806	0.1892	0.1508	0.1676	0.1721	0.1316	0.1388	0.1435	0.0833
(26) <i>Tetramicra brevifilum</i>	0.1288	0.0324	0.0741	0.1068	0.0675	0.1671	0.0322	0.1806	0.1099	0.0292	0.0356	0.0357	0.1476
(27) <i>Vairimorpha necatix</i>	0.3433	0.3393	0.3482	0.3378	0.3505	0.3286	0.3342	0.3496	0.3393	0.3389	0.3470	0.3475	0.3512

## Continuação da Tabela

	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	26)	(27)
(1) <i>Kabatana sp.</i>														
(2) <i>Glugea americanos</i>														
(3) <i>Kabatana taketay</i>														
(4) <i>Kabatana sp.</i> CG 2009a														
(5) <i>Kabatana sp.</i> JS- 2012														
(6) <i>Microsporidia sp.</i> RW-2009a														
(7) <i>Microsporidia sp.</i> GC-2010														
(8) <i>Microsporidia sp.</i> CHW-2012														
(9) <i>Potaspora morhaphis</i>														
(10) <i>Spraguea lophii</i>														
(11) <i>Spraguea sp.</i> SDU- 2008														
(12) <i>Spraguea sp.</i> MB 2010														
(13) <i>Glugea anomala</i>														
(14) <i>GlugeaAtherinae</i>														
(15) <i>Heterosporis angillarum</i>	0.0676													
(16) <i>Heterosporis sp.</i>	0.0690	0.0323												
(17) <i>Ichthyosporidium sp.</i>	0.1381	0.1256	0.1254											
(18) <i>Loma embiotocia</i>	0.1200	0.1122	0.1269	0.1029										
(19) <i>Loma salmonae</i>	0.1149	0.1074	0.1210	0.0934	0.0095									
(20) <i>Loma sp.</i>	0.1164	0.1215	0.1243	0.1011	0.0151	0.0151								
(21) <i>Microgemma caulleryi</i>	0.2185	0.1993	0.2096	0.2483	0.2373	0.2360	0.2370							
(22) <i>Microsporidium sp.</i>	0.0625	0.0383	0.0441	0.1127	0.1053	0.1005	0.1117	0.2068						
(23) <i>Pleistophora ehrenbaumi</i>	0.0749	0.0455	0.0553	0.1229	0.1165	0.1165	0.1262	0.2048	0.0408					
(24) <i>Pleistophora finisterrensis</i>	0.0101	0.0620	0.0746	0.1296	0.1117	0.1070	0.1160	0.2209	0.0503	0.0714				
(25) <i>Pleistophora typicalis</i>	0.0773	0.0477	0.0578	0.1251	0.1188	0.1187	0.1285	0.2073	0.0431	0.0024	0.0736			
(26) <i>Tetramicra brevifilum</i>	0.1412	0.1312	0.1286	0.1721	0.1758	0.1718	0.1724	0.1130	0.1256	0.1379	0.1437	0.1406		
(27) <i>Vairimorpha necatix</i>	0.3361	0.3486	0.3784	0.3518	0.3544	0.3543	0.3745	0.3757	0.3490	0.3474	0.3326	0.3495	0.3413	

No presente estudo verificou-se que há 55 de suporte de *bootstrap* para o clado composto pelo gênero *Kabatana*. Este resultado aproximou-se aos cladogramas obtidos por Lom, Nilsen e Urawa (2001) e Casal et al. (2010), sendo seus cladogramas sustentados por valor de *bootstrap* 72.

O clado constituído das espécies de *Kabatana* não possui relação com a localização geográfica. *Kabatana takedai* encontrada no hospedeiro *Oncorhynchus masu* foi oriunda do Japão (LOM; NILSEN; URAWA, 2001) e *Kabatana* sp. JS-2012 (SANDERS et al., 2012) parasitando *Clevelandia ios*, capturadas na Califórnia, com exceção do *Kabatana rondoni* (CASAL et al., 2010) registrada em *Gymnorhamphichthys rondoni* que pertencem ao rio Amazonas.

Além disso, os peixes parasitados são de famílias diferentes, dificultando a realização de qualquer inferência filogenética baseada na localização geográfica e afinidades filogenéticas dos hospedeiros destes microparasitos. Baber et al. (2009) também registraram *Kabatana* sp. infectando *Gobiusculus flavescens* do Oceano Atlântico o que evidencia a ocorrência deste gênero em hospedeiros de águas marinhas e continentais.

O mesmo gênero teve o valor de *bootstrap* muito baixo, não fornecendo uma boa sustentação neste clado. Apesar de terem agrupado no mesmo ramo, a probabilidade que o *Kabatana* sp. do presente estudo seja mais similar a *K. rondoni* (CG 2009a) por estarem inseridos na mesma região neotropical que possui as mesmas estruturas ecológicas. No entanto, verificou-se na distância *p* que estas espécies ficaram afastadas, o que sugere de tratar-se de outra espécie.

#### 6.4. CONCLUSÃO

A análise filogenética e morfológica é afirmar tratar-se de nova espécie de *Kabatana* sp. infectando *Brachyplatystoma rousseauxii*, sendo esta a primeira descrição deste microparasito neste peixe amazônico.

## 6.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.; MATOS, E. *Amazonspora hassar* n. gen. and n. spp. (Phylum Microsporida, fam. Glugeidae), a parasite of the Amazonian fish, *Hassar orestis* (Fam. Doradidae). **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 336-341. 2003.

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

BARTHEM, R.; GOULDING, M. **The Catfish Connection: Ecology, Migration and Conservation of Amazon Predators**. Columbia University Press: New York, 144p. 1997.

BARBER, I.; et al.. First record of a *Kabatana* sp. microsporidium infecting fish in the Atlantic Ocean. **Diseases of aquatic organisms**, v. 83, p. 145-152. 2009.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em: [www // blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov). Acesso em: 02/09/2013.

CASAL, G.; et al.. 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. 2008.

CASAL, G.; et al.. Morphological and genetical description of *Loma psittaca* sp. n. isolated from the Amazonian fish species *Colomesus psittacus*. **Parasitology Research**, v.105, n.5, p.1261-71.2009.

CASAL, G.; et al.. Ultrastructural and molecular characterization of a new microsporidium parasite from the Amazonian fish, *Gymnorhamphichthys rondoni* (Rhamphichthyidae). **Journal Parasitology**, v. 96, n. 6, p-1155-1163. 2010.

DIDIER, E.S.; et al.. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. **Veterinary Parasitology**, v.126, p. 145-166. 2004.

DIDIER, E.; WEISS, L. M. Microsporidioses: current status. **Curr .Opin. Infect. Dis.** October, v.19, n. 5, p. 485-492. 2006.

DIKOVÁ, I.; LOM, J. Histopathology of *Kabatana arthuri* (Microspora) infection in sutchi catfish, *Pangasius sutchi*. **Folia parasitologica**, v. 47,p.161-166. 2000.

DWORKIN, M. S.; et al.. Prevalence of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus infected patients with diarrhea in major United States cities. **Revista Instituto de Medicina Tropical. São Paulo**, v.49, n.6, p.339-342. 2007.

FREEMAN, M. A.; YOKOYAMA, H.; OGAWA.. A microsporidian parasite of the genus *Spraguea* in the nervous tissues of the Japanese anglerfish *Lophius litulon*. **Folia Parasitologica**, v. 51, p. 167–176. 2004.

GATEHOUSE, H. S.; MALONE, L. A.. The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora): DNA sequence for small and large subunit rRNAs and evidence of a large tandem repeat unit size. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.71, p. 97–105. 1998.

GONÇALVES, E. M.N; et al.. Microsporidiosis in a Brazilian university hospital. Case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. S. Paulo, v. 48, n.6,p.351-352. 2006.

HALL, T. BioEdit. Biological sequence alignment editor for Win95/98/ NT/ 2K/ XP. Carlsbad, CA: Ibis Biosciences. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. 2007.

IBAMA. **Estatística da Pesca 2007: Brasil grandes regiões e unidades de Federação**. Brasília, 2007.

LEE, S. C; et al.. Microsporidia Evolved from Ancestral Sexual Fungi Current. **Biology** , v. 18, p. 1675-1679, 2008.

LOM, J. A.; DYKOVÁ, I. Microsporidian xenomas in fish seen in wider perspective. **Folia Parasitology**, v. 52, p. 69-81. 2005.

LOM, J.; NILSEN, F., URAWA, S..Redescription of *Microsporidium takedai* (Awakura, 1974) as *Kabatana takedai* (Awakura, 1974) comb. n. **Diseases of aquatic organisms**, v. 44, p.223–230. 2001.

LOM, J.; NILSEN, F..Fish microsporidia: fine structural diversity and phylogeny. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p.107–127. 2003.

MANZI, R. S.; et al.. Microsporídiöse humana e Importância médica: uma revisão. **Revista de Parasitologia Tropical**, v.32, n. 1, p. 15-32. 2003.

BRASIL. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. Boletim estatístico da Pesca e aquicultura. Brasília, 2011.

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.

MLADINEO, I.; LOVY, J.. A new xenoma-forming microsporidium infecting intestinal tract of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). **Acta Parasitologica**, v. 56, p. 339-347. 2011.

MOR, S. M.; et al.. Microsporidiosis and malnutrition in children with persistente diarrhea, Uganda. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n. 1. 2009

PERKINGS, F.O. ‘Sporozoa’: Apicomplexa, Microsporidia, Haplosporidia, Paramyxia, Myxosporidia and Actinosporidia. In: *Microscopic Anatomy of Invertebrates (Protozoa)*

(Harrison, F. W. & Corliss, J. O.,Eds.), v. 1, **Wiley-Liss Inc.**, New York, NY, pp. 261-331. 1991.

SANDERS, J.; et al. *Ichthyosporidium weissii* n. sp. (Microsporidia) Infecting the Arrow Goby (*Clevelandia ios*). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n.3, p. 258–267. 2012.

SANTOS, F.; FERREIRA, F.; ZUANON, J. **Peixes comerciais de Manaus**. Ibama/AM. Próvarzea. 2006.144p.

SAITOU, N.; NEI, M.. The neighbor-joining method: **a new methors for reconstructing phylogenetic trees** **Molecular Biology and Evolution**, p.406-425.1997.

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**. Tese de Doutorado - Universidade Federal Fluminense. 2011.

TAMURA, K.; et al.. **MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods**. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, n.10, p. 2731-2739. 2011.

VOSSBRINCK, C. R.; BAKER, M. D.; DIDIER, E. S., Debrunner-Vossbrinck, B. A. and Shadduck, J. A.. Ribosomal DNA sequences of *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon cuniculi*: species identification and phylogenetic construction. **Journal Eukaryotic of Microbiology**, v. 40, p. 354–362. 1993.

WASSON, K.; PEPPER, R.L.Mammalian Microsporidiosis. **Veterinary Pathology**. v.37,p.113. 2000.

XU, Y.; WEISS, L.M. The microsporidian polar tube: A highly specialised invasion organelle. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 941–953. 2005.

## 7. CAPÍTULO IV: PARASITISMO POR MIXOSPORÍDIOS EM *Brachyplatystoma rousseauxii* e *Mugil curema*: PRIMEIRO RELATO

### RESUMO

São descritas as características morfológicas, ultraestruturais e moleculares de mixosporídios em *Brachyplatystoma rousseauxii* e *Mugil curema* provenientes da pesca industrial e artesanal do município de Vigia de Nazaré e distrito de Mosqueiro, município de Belém, estado do Pará. Para isso, entre março de 2010 a junho de 2012, 62 exemplares de *B. rousseauxii* (dourada) e 58 de *M. curema* (pratiqueira), foram examinados e fragmentos de órgãos parasitados processados, conforme técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão e técnicas de biologia molecular, objetivando o estudo de parasitismo por microparasitos. Em 53 (85,48%) exemplares de *B. rousseauxii* de 62 examinados foram encontrados mixosporídios dos gêneros *Ellipsomyxa*, *Meglishchia*, *Myxobolus* e *Henneguya* e em 58 de *M. curema* 34 (58,6%) apresentaram-se parasitados por microparasitos identificados como os dos gêneros *Myxobolus* e *Ellipsomyxa*. Estes são os primeiros registros nos dois hospedeiros da Região Amazônica; os mixosporídios encontrados parasitando a dourada e *Myxobolus* sp. a pratiqueira apresentaram características morfológicas, sugestivas de novas espécies.

Palavras- chaves: *Ellipsomyxa* sp., *Meglishchia* sp., *Myxobolus* sp., *Henneguya* sp., Myxospora.

## ABSTRACT

We describe the morphological, ultrastructural and molecular mixosporídios in *Brachyplatystoma rousseauxii* and *Mugil curema* from industrial fishing and artisanal Vigia de Nazare and Mosqueiro district , in Belém , Pará are For that, between March 2010 June 2012 , 62 specimens of *B. rousseauxii* (catfish) and 58 *M. curema* ( white mullet ) were examined and fragments of infected organs processed as techniques for light microscopy and transmission electron and molecular biology techniques , aiming at the study of parasitism by microparasites . 53 (85.48 % ) specimens of *B. rousseauxii* of 62 examined were found myxosporean gender *Ellipsomyxa*, *Meglishchia* and *Myxobolus*, *Henneguya* and 58 *M. curema* 34 ( 58.6 % ) were parasitized by microparasites identified as the genera *Myxobolus* and *Ellipsomyxa*. These are the first records in the two hosts of the Amazon region, the myxosporean found parasitizing the golden *Myxobolus* sp. white mullet showed the morphological characteristics suggestive of new species.

Keywords: *Ellipsomyxa* sp.. *Meglishchia* sp.. *Myxobolus* sp.. *Henneguya* sp.. Myxospora

## 7.1. INTRODUÇÃO

O interesse dos pesquisadores pelo Filo Myxozoa aumentou consideravelmente, não apenas pelo surgimento de novos patógenos emergentes, que ameaçam o desenvolvimento da piscicultura, mas também por novas descobertas sobre o ciclo biológico e as questões relacionadas à origem e filogenia dos myxosporídios fornecendo um estímulo adicional para o seu estudo (LOM; DYKOVÁ, 2006).

Durante anos a classificação taxonômica dos mixosporídios foi motivo de discussão entre os estudiosos e até 1990 eles foram alocados no Reino Protista. No entanto, por apresentarem esporos multicelulares e estruturas como cápsulas polares que proporcionavam similaridade com os nematocitos dos cnidários e isso passou a ser questionado pelos pesquisadores (SMOTHERS et al., 1994). Foi através do sequenciamento do gene 18S rDNA realizado por Cavalier-Smith (1998) que este grupo passou a ser considerado como metazoários.

Os mixosporídios caracterizam-se por reunir organismos microscópicos que apresentam dimensões e estruturas extremamente reduzidas. Seu ciclo biológico encerra estágios vegetativos na forma de esporos em hospedeiros vertebrados e invertebrados (FIALA; BARTOSOVÁ, 2010), que dependendo da espécie caracterizam-se pela junção de duas a sete valvas que apresentam uma a sete cápsulas polares, cada uma contendo em seu interior um filamento espiralado denominado de filamento polar (LOM; DYKOVÁ, 2006).

Diante disso, estudos vêm sendo realizados para descrever a morfologia, ultra-estrutura e caracterização molecular de novas espécies e os aspectos patológicos relacionados aos danos sanitários que algumas espécies podem acarretar em peixes importantes recursos pesqueiros. Dentre essas espécies, encontram-se *Mugil curema* e *Brachyplatystoma rousseauxii* que são comercializadas em todo o território brasileiro.

O presente estudo, objetivou identificar mixosporidioses em *B. rousseauxii* e *M. curema* provenientes do município de Vigia de Nazaré e Distrito de Mosqueiro, município de Belém, estado do Pará, descrevendo as características morfológicas, ultraestruturais e moleculares dos agentes.

## **7.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **7.2.1. MATERIAL**

#### **7.2.1.1. Origem das amostras**

No período de março de 2010 a junho de 2012 foram necropsiados 62 exemplares de dourada, *Brachyplatystoma rousseauxii* Casteunau, 1855, provenientes de indústrias pesqueiras e de pescadores artesanais do município de Vigia de Nazaré e do Distrito de Mosqueiro, município de Belém, estado do Pará.

### **7.2.2 MÉTODOS**

Os exemplares foram capturados com o uso de apetrechos de pesca como tarrafas (pesca artesanal) e redes de emalhar (pesca industrial) e as colheitas dos exemplares foram realizadas de forma aleatória, à chegada das embarcações pesqueiras e os exemplares acondicionados em caixas de isopor contendo gelo e transportados até o Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo (LPCA/UFRA) onde foram examinados.

#### **7.2.2.1 Microscopia de luz**

Os exemplares foram examinados, com auxílio de estereomicroscópio, iniciando-se pela superfície externa e em seguida por seus órgãos internos. Pequenos fragmentos sugestivos de cistos ou lesões foram coletadas e colocados sobre lâmina com água e lâmínula para observação à microscopia de luz. Confirmada a presença de microparasitos, os tecidos foram fixados, corados e clarificados. A forma de coleta, fixação e clarificação baseou-se nos protocolos dos trabalhos de Behmer e Tolosa (1976) e Luna (1968).

A fixação foi feita em solução de Davidson (álcool 95%, formaldeído, ácido acético e água destilada), obedecendo à proporção de nove partes de fixador para uma de tecido, permanecendo por 24 horas, com a finalidade de impedir a ação autolítica.

Em seguida, foi feita a desidratação em concentrações crescente de álcool (70%, 80%, 90%, absoluto I, absoluto II, absoluto III), permanecendo em cada solução por uma hora. Ao término desta etapa, o material foi diafanizado, através de imersões sucessivas em

álcool/xilol (50:50) com duração de uma hora e em xilol I e xilol II pelo tempo de trinta minutos cada.

O material foi então impregnado por parafina líquida passando pelas parafinas I, II e III, em uma estufa a 60°C, obedecendo a um intervalo de meia hora em cada fase. Ao término desta etapa realizou-se a inclusão em parafina e posteriormente a microtomia (micrótomo ROTARY MICROTOME MICRON HM315) e coloração das lâminas por Hematoxilina-Eosina (HE).

A documentação fotográfica dos esporos e sua mensuração foram realizadas em um microscópio Leica DM 1000 acoplado a um computador com o software Leica Application suite versão 1.6.0 de captura de imagens. As mensurações foram realizadas de acordo com o padrão de Lom e Arthur (1989).

#### **7.2.2.2 Microscopia eletrônica**

Para a realização de microscopia eletrônica de transmissão (MET), pequenos fragmentos das regiões parasitadas foram removidos e fixados em glutaraldeído 3%, em 0,2 M de cacodilato de sódio tamponado (pH 7.2) por 3 h a 4°C. Em seguida, fez-se a lavagem com o mesmo tampão por 2-4 h a 4°C, e pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2% tamponado, por 2 horas na mesma temperatura (AZEVEDO et al., 2011b).

Os materiais foram desidratados em séries crescentes de etanol e óxido de propileno, embebidos e incluídos em Epon. Para obtenção de cortes ultrafinos foi utilizado o ultramicrótomo (Leica) e os cortes ultrafinos contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. A observação foi feita em microscópio eletrônico (Zeiss EM 900), operando a 80 kV

#### **7.2.3 Técnicas moleculares**

Fragmentos do órgão contendo oocistos de *Calyptospora* sp. foram fixados em álcool etílico 80% e conservados sob refrigeração para serem submetidos aos procedimentos de biologia molecular visando a identificação de prováveis novas espécies, relacionando a posição filogenética entre espécies. A metodologia foi conduzida no Laboratório de Tecnologia Biomolecular (LTB) da Universidade Federal do Pará do Instituto de Ciências Biológicas e compreendeu as seguintes etapas:

### 7.2.3.1. Extração e Amplificação

Para a extração do DNA utilizou-se o kit NucleoSpinTissue XS (MACHEREY-NAGEL GmbH&Co). Para quantificação do produto da extração foi utilizado o conteúdo de DNA total, o qual foi visualizado em gel de agarose 1.5%, usando o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific) a 260 nm.

As análises moleculares foram baseadas no rDNA 18S e amplificadas conforme os trabalhos de Andree et al.(1999), Mólnar (2002), Eszterbauer (2004) e Adriano et al. (2009b). Para a amplificação dos genes, iniciadores específicos foram utilizados, conforme a Quadro 11. Estimou-se o produto amplificado através da comparação com o padrão de banda 1Kb *Plus DNA Ladder Invitrogen*®.

Quadro 11. Iniciadores utilizados para amplificação do gene 18S rDNA.

Iniciador	Sequências	Referência
MX5 (senso)	5'- CTGCGGACGGCTCAGTAAATCAGT-3'	Andree et al.(1999)
MX3 (anti-senso)	5'- CCAGGACATCTTAGGGCATCACAGA-3'	Andree et al.(1999)
MC5 (senso)	5'- CCTGAGAAACGGCTACCACATCCA-3'	Mólnar (2002)
MC3 (anti-senso)	5'- GATTAGCCTGACAGATCACTCCACCGA-3'	Mólnar (2002)

A reação de cadeia de polimerase (PCR) consistiu num volume final de 25 µl, o qual continha 10-50 ng do DNA extraído, 1x tampão de *Taq* DNA polimerase, 0,2 mmol de dNTP, 1,5 mmol de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 pmol de cada iniciador e 0,25 mL (1,25 U) de *Taq* ADN polimerase (Invitrogen), o termociclador utilizado foi Axigem Maxygene III.

Nas amostras de *Myxobolus* sp., o programa de temperaturas foi: 98°C por cinco minutos; 35 ciclos de 95° por um minuto, 66°C por um minuto e 72°C durante um minuto; seguidos de 72°C por sete minutos. No caso do *Ellipsomyxa* sp., as temperaturas e tempo foram as mesmas citadas acima, com exceção da temperatura de anelamento que foi de 65 °C.

Para amostras de *Henneguya* sp. e *Meglishchia* sp o seguinte programa foi utilizado: 95°C por cinco minutos, seguido de 95° por um minuto, 66°C por um minuto e 72°C durante um minuto por 35 ciclos, finalizando a 72°C por sete minutos.

Após as amplificações, retirou-se 4 µl de cada PCR para visualização em gel de agarose 1,5% (60 mL de TAE1X, 0,9 g de agarose). Para comparação do produto amplificado, utilizou-se o padrão de banda 1Kbplus DNA ladder Invitrogen®.

### 7.2.3.2. Purificação e clonagem dos Produtos de PCR

Nas purificações utilizou-se Kit (GFX PCR DNA and Gel Band Purification) e os produtos do PCR purificado foram clonados com o Kit na PCR ® vetores 4-TOPO do TOPO-TA Cloning ® kit (Invitrogen), seguindo-se o protocolo dos seus respectivos fabricantes e a bactéria utilizada para clonagem foi *Escherichia coli* JM 109.

### 7.2.3.3. Sequenciamento de DNA e Análise filogenética

Um único clone foi sequenciado usando primers M13R e M13F, o Big Dye ® Terminatorv 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™) e o ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems™). As sequências de DNA foram montadas e editadas com auxílio do programa BioEdit (HALL, 2007).

Para análise filogenética empregou-se a ferramenta do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para realização de comparações de homologias e obtenção das sequências mais próximas para a construção de árvores filogenéticas. Para avaliar a relação de novas espécies de outros Mixosporidia foi realizada uma busca de homologia utilizando o software *Blast*. Comparou-se 17 sequências de rDNA pertencentes ao Mixosporidia que tinham peixes como hospedeiros. A sequência de mixosporídios e número do NBCI de acesso dos dados obtidos a partir do *Genbank* estão no Quadro 12.

Quadro 12. Número de acesso do *Genbank* das sequências de 18S rDNA de 17 mixosporídios parasitos de espécies de peixes utilizado para análise filogenética.

<b>Espécie de Microsporidio</b>	<b>Número do NCB</b>
<i>Henneguya exilis</i>	AF021881
<i>Henneguya ictaluri</i>	AF195510
<i>Henneguya adiposa</i>	EU492929
<i>Henneguya gurlei</i>	DQ673465
<i>Henneguya pellis</i>	FJ468488
<i>Henneguya sutherlandi</i>	EF191200
<i>Henneguya suprabranchiae</i>	JN201199
<i>Henneguya multiplasmoidalis</i> ZUEC31	JQ654969
<i>Myxobolus oliveirai</i>	HM754633
<i>Henneguya</i> sp.	EU732599
<i>Myxobolus machidai</i>	AB693054
<i>Myxobolus</i> sp. KU-2010	HQ166720
<i>Myxobolus</i> sp. WSK-2013	KC733438
<i>Myxobolus hakyi</i> HNHM-70187	FJ816269
<i>Ceratomyxa shasta</i>	AF001579
<i>Aurantiactinomyxon mississippiensis</i>	AF021878
<i>Aurantiactinomyxon</i> sp. KAB-2001	AF378356

As análises filogenéticas foram realizadas com 1000 replicatas de *bootstrap*, utilizando-se o método de *Neighbor-Joining* (NJ) (SAITOU; NEI, 1997), implementado no software MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011).

### 7.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 7.3.1. *Brachyplatystoma rousseauxii*

Em 53/62 (85,48%) de exemplares de *B. rousseauxii* examinados, foram encontrados mixosporídios dos gêneros *Ellipsomyxa*, *Meglishchia*, *Myxobolus* ou *Henneguya*.

##### 7.3.1.1 *Ellipsomyxa* sp.

Nos três exemplares parasitados por *Ellipsomyxa* sp., observou-se, nas preparações a fresco, pouca quantidade de esporos distribuídos na bile (Figura 21A e B). Os esporos apresentaram 8,7 $\mu$ m x 9,3 $\mu$ m e suas cápsulas polares 4,5  $\mu$ m de comprimento por 4,0  $\mu$ m de largura.

Figura 21. *Brachyplatystoma rousseauxii*. Fotomicrografia de luz: **A.** Esporos de *Ellipsomyxa* sp. (Cabeça de seta), parasitando vesícula biliar, em preparação a fresco. Bar. Esc.: 20 $\mu$ m. **B.** Contraste por interferência diferencial (Nomarski/ DIC), mostrando as cápsulas polares (CP) de *Ellypsomixa* sp. Bar. Esc.: 10 $\mu$ m.



Os valores mensurados de *Ellipsomyxa* sp. são maiores que os abordados por Koie (2003) que assinalou esporos com 7,0  $\mu$ m de comprimento, 8,7  $\mu$ m de largura e 3,1  $\mu$ m de comprimento e largura das cápsulas polares e Koie e Karlsbakk (2009) que registraram esporos de *Ellipsomyxa syngnathi* com 6,8  $\mu$ m de comprimento, 8,1  $\mu$ m de largura, 3,6  $\mu$ m de comprimento da cápsula polar e 2,5  $\mu$ m de largura da cápsula polar.

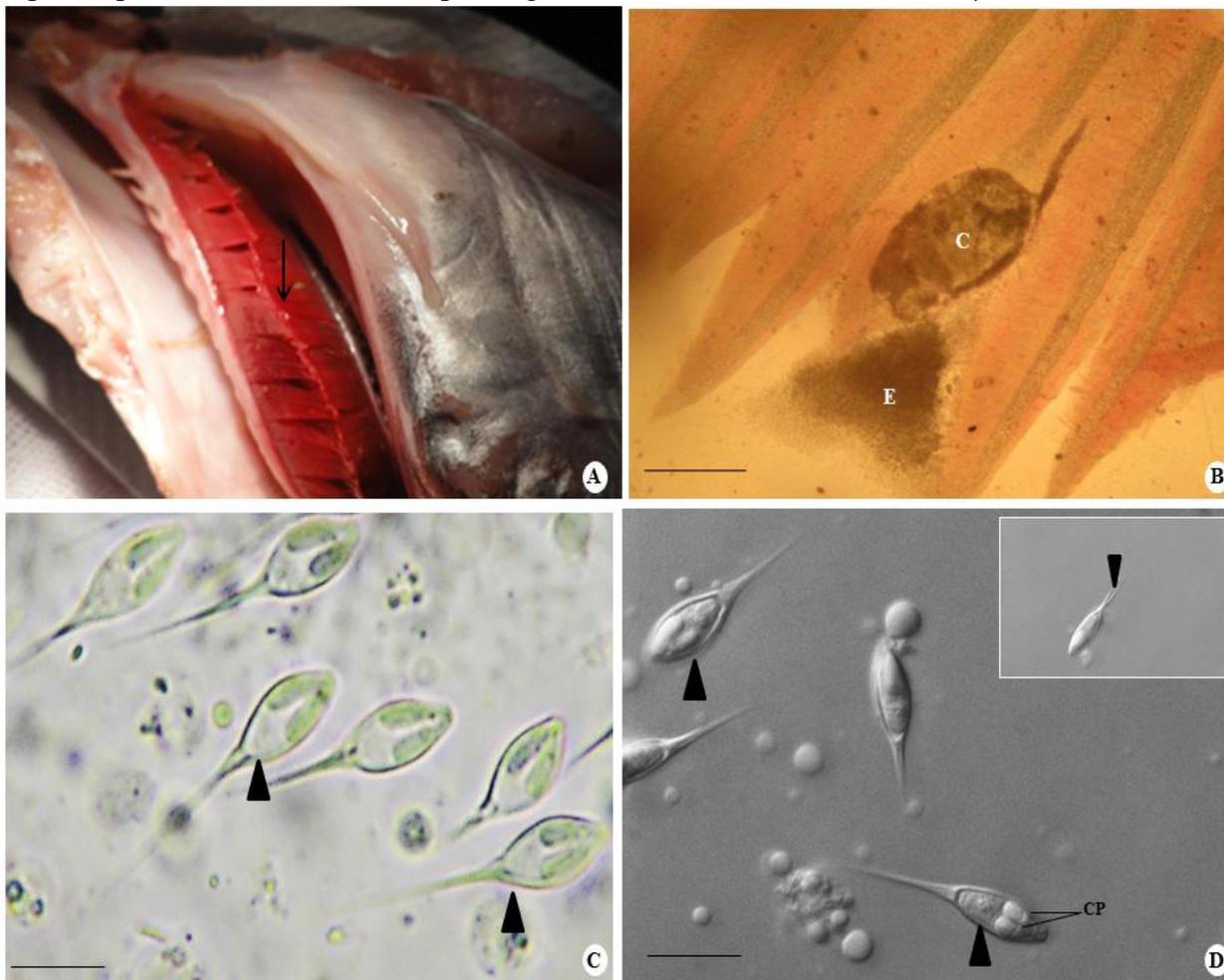
Recentemente, Azevedo et al. (2013) encontraram uma nova espécie de *Ellipsomyxa* que apresentou esporo com comprimento do esporo de 7,0  $\mu\text{m}$  e largura de 8,7  $\mu\text{m}$ , suas capsulares polares medindo 3,1  $\mu\text{m}$  de largura e comprimento, valores menores ao encontrado neste estudo. Os dados morfológicos e a especificidade parasitária do presente estudo sugerem a ocorrência de uma nova espécie.

#### **7.3.1.2 *Henneguya* sp.**

Dos 62 exemplares examinados, 19,3% estavam parasitados pelo gênero *Henneguya*, observando-se cistos entre os filamentos brânquias, de formato ovóide e aspecto leitoso (Figura 2A) que foram removidos e pressionados para liberação dos esporos (Figura 2B).

Na análise morfológica identificou-se no esporo os seguintes aspectos estruturais: a presença de corpo elipsóide, duas valvas posicionadas que se prolongam paralelamente a linha de sutura, originando projeções caudais, as cápsulas polares dispostas próximas uma das outras, ocupando apenas a região mediana do esporo e tamanhos simétricos, as estruturas observadas são compatíveis com o gênero *Henneguya* (Figura 22C e D), conforme a classificação proposta por Lom e Diková (2006).

Figura 22. *Brachyplatystoma rousseauxii*. *Henneguya* sp.: **A.** Brânquia apresentando cistos de *Henneguya* sp. (seta). Fotomicrografia de luz: **B.** Preparação a fresco de filamentos branquiais apresentando cisto rompido (C) e esporos livres (E) X 40. **C.** Esporos (cabeça de seta), com observação das cápsulas polares (CP) X 100. **D.** Contraste por interferência diferencial (Nomarski/ DIC), mostrando esporos de *Henneguya* sp. (cabeça de seta) com as cápsulas polares (CP). Detalhe do prolongamento caudal (seta). Bar. Esc.: 5µm.



O gênero *Henneguya* tem sido descrito em várias espécies de peixes teleósteos do litoral brasileiro (VITA et al., 2003; MATOS, TAJDARI, AZEVEDO, 2005; FEIJÓ et al., 2008; EIRAS; TAKEMOTO; PAVANELLI, 2009).

Na microscopia eletrônica de transmissão, observou-se esporoplasma contendo numerosos esporoplasmosomas globulares e dois núcleos (Figura 23A), duas cápsulas polares (Figura 23B) e o filamento polar apresentando sete voltas (Figura 23C). Estruturas que foram também observadas em trabalhos que descrevem a ocorrência desse mixosporídios em peixes (ADRIANO; ARANA; CORDEIRO, 2005; AZEVEDO et al., 2008; AZEVEDO et al., 2009).

Figura 23. *Brachyplatystoma rousseauxii*. Eletromicrografia de transmissão: A. Corte transversal do esporo de *Henneguya* sp., com observação de dois núcleos (N) e esporoplasmosomos (EP). Bar. Esc.: 6  $\mu$ m. B. Visão transversal de um esporo de *Henneguya* sp., com observação das cápsulas polares (CP). Bar. Esc.: 6  $\mu$ m. C. Visão longitudinal de uma cápsula polar (CP) apresentando filamento polar (FP) em seu interior. Bar. Esc.: 6  $\mu$ m.



Um desenho esquemático com base na microscopia de luz, microscopia de transmissão eletrônica e de contraste diferencial mostra o esporo com cápsulas polares, núcleo e filamento polar (Figura 24).

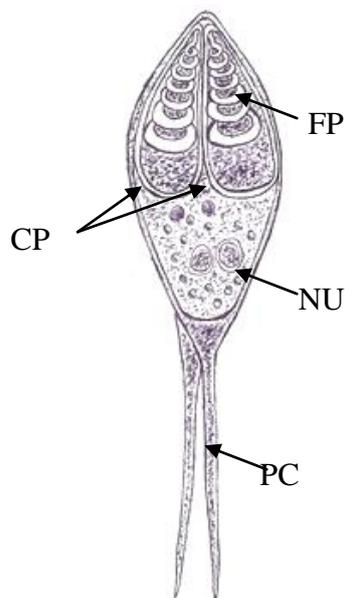


Figura 24. Desenho esquemático de *Heneguya* sp. parasita de *B. rousseauxii*, peixe de água estuarina, mostrando a forma e tamanho do esporo, prolongamento caudal (PC), duas cápsulas polares iguais (CP), com 7 filamentos polares (FP) e núcleo (NU). Bar. Esc.: 5 $\mu$ m

Na análise morfométrica foram realizadas medições dos principais elementos que auxiliam na diferenciação entre as espécies deste gênero, como o comprimento total do esporo, comprimento da cauda do esporo e da cápsula polar, além da largura do esporo e cápsula polar, sendo conferido também o número de voltas do filamento polar. Estas estruturas foram mensuradas através das imagens de microscopia de luz, no entanto, a quantidade de voltas do filamento polar foi obtida pela imagem da MET, permitindo assim, a sua comparação com outros registros deste gênero, conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Comparação das dimensões ( $\mu\text{m}$ ) dos esporos de *Henneguya* spp., parasitando peixes teleósteo do litoral brasileiro.

Espécie	Região	Hospedeiro	CT	CE	LE	CC	CCP	LCP	NVFP	Autores
<i>H. striolata</i>	Rio Amazonas	<i>Serrasalmus striolatus</i>	42,2	15,8	5,3	25,9	6,8	1,2	13-14	Casal, Matos e Azevedo (1997)
<i>H. astyanax</i>	Rio Amazonas	<i>Astyanax keithi</i>	47,8	15,2	5,7	32,6	5,0	1,5	7-8	Vita et al. (2003)
<i>H. friderici</i>	Rio Amazonas	<i>Leporinus friderici</i>	33,8	10,4	5,7	23,3	4,98	2,14	7-8	Casal, Matos e Azevedo (2003)
<i>H. pilosa</i>	Tersina - Piauí	<i>Serrasalmus altuvei</i>	54,2	21,1	5,9	33,1	7,4	1,2	11-12	Azevedo e Matos (2003)
<i>H. rhamdia</i>	Rio Amazonas	<i>Rhamdia quelen</i>	50,0	13,1	5,2	36,9	4,7	1,1	10-11	Matos, Tajdari e Azevedo (2005)
<i>H. Piaractus</i>	São Paulo	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	59,6	12,8	4,1	46,4	6,5	1,2	8-9	Adriano, Arana e Cordeiro (2005)
<i>H. rondoni</i>	Rio Amazonas	<i>Gymnorhamphichthys rondoni</i>	17,7	7,0	3,6	10,7	2,5	0,85	6,7	Azevedo et al. (2008)
<i>H. arapaima</i>	Rio Araguaia-Brasil	<i>Arapaima gigas</i>	48,4-53,1	13,5-15,2	5,1-6,1	38,0-41,2	6,3-6,8 6,2-6,6	1,4-1,6	5	Feijó et. al (2008)
<i>H. corruscans</i>	Rio Paraná	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	27,6	14,3	5,0	13,7	6,8	2,0	5-6	Eiras, Takemoto e Pavanelli (2009)
<i>H. garavelli</i>	São Paulo	<i>Cyphocharax nagelli</i>	46,6,	13,6	4,0	28,9	5,4	1,2	8-9	Martins e Onaka (2006)
<i>H. pseudoplatystoma</i>	São Paulo/ Mato Grosso do Sul	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> e <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	33,2	10,4	3,4	22,7	3,3	1,0	6-7	Naldoni et. al. (2009)
<i>Henneguya</i> sp.	Pará	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	24,5	6,5	5,5	13,5	5,7	1,5	7-8	Presente estudo

CT: comprimento total, CE: comprimento do esporo, LE: largura do esporo, CC: comprimento da cauda, CCP: comprimento da cápsula polar, LCP: largura da capsula polar, NVFP: número de voltas do filamento polar

As dimensões demonstradas na Tabela 2 mostraram comprimento total e do esporo superiores ao encontrado no presente estudo, exceto para *H. rondoni* (AZEVEDO et al., 2008). A largura do esporo teve medida aproximada para a maioria dos registros observados. No entanto, seu valor foi inferior aos registrados por Adriano, Arana e Cordeiro (2005), Azevedo et al. (2008), Martins e Onaka (2006), Naldoni et. al. (2009).

O comprimento da cápsula polar ficou próximo aos descritos por Vita et al. (2003), Casal, Matos e Azevedo (2003), Matos, Tajdari e Azevedo (2005) e Martins e Onaka (2006), divergindo no entanto dos estudos de Casal, Matos e Azevedo (1997), Azevedo e Matos (2003), Adriano, Arana e Cordeiro (2005), Feijó et. al. (2008), Eiras, Takemoto e Pavanelli (2009) que foram maiores. Azevedo et al. (2008) e Naldoni et. al. (2009) referenciaram comprimentos da cápsula polar menores aos encontrados neste estudo.

Eiras, Takemoto e Pavanelli (2009) realizaram estudos em *Pseudoplatystoma corruscans*, identificando uma nova espécie de *Henneguya* a qual apresenta o comprimento da cauda próximo ao encontrado nesta pesquisa, Azevedo et al. (2008), avaliando *H. rondoni* observaram valor inferior e os demais autores como Vita et al. (2003), Matos, Tajdari e Azevedo (2005) e Martins e Onaka (2006) reportaram comprimentos maiores.

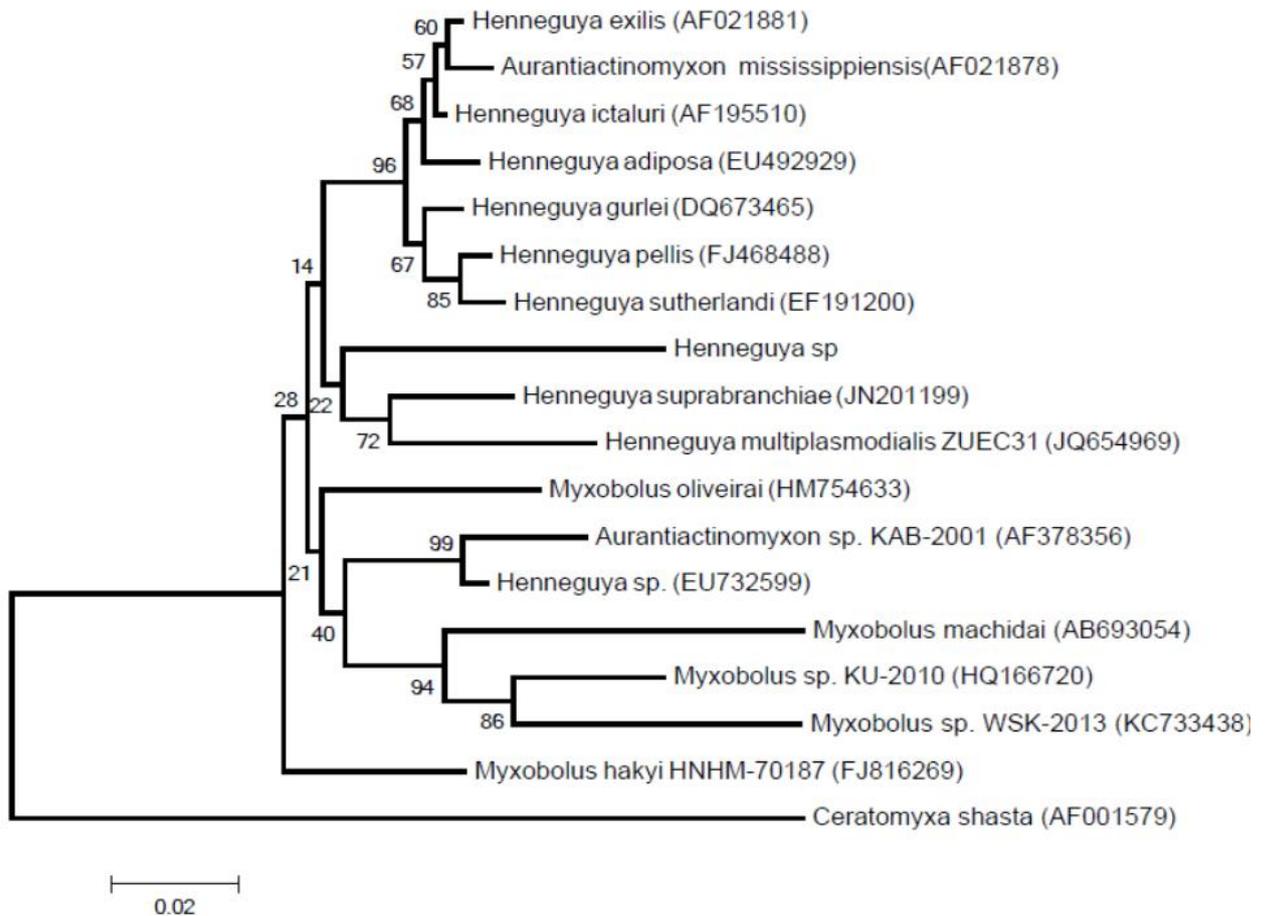
Casal, Matos e Azevedo (2003) e Eiras, Takemoto e Pavanelli (2009) registraram novas espécies de *Henneguya*, *H. friderici* e *H. corruscans*, respectivamente, que possuem a largura da cápsula polar maiores que a assinalada neste trabalho. No entanto, Vita et al. (2003) descreveram *H. astyanax* com a mesma largura. Outros autores relataram larguras próximas ao encontrado no presente estudo (CASAL, MATOS; AZEVEDO, 1997; AZEVEDO; MATOS, 2003; MATOS, TAJDARI; AZEVEDO, 2005; ADRIANO; ARANA; CORDEIRO, 2005; FEIJÓ et. al., 2008; MARTINS; ONAKA, 2006; NALDONI et. al., 2009) .

Em relação ao número de voltas do filamento polar, os trabalhos de Vita et al. (2003), Casal, Matos e Azevedo (2003), Azevedo et al. (2008) e Naldoni et. al. (2009) apresentaram valores que corroboram o achado neste estudo. Estudos realizados por Azevedo et al. (2008), Feijó et. al. (2008), Eiras, Takemoto e Pavanelli (2009) observaram número de voltas do filamento polar menor. Outros autores que constam na tabela descrevem quantidades maiores de voltas.

A análise filogenética (Figura 25) construída pelo método de *Neighbor-Joining* inferiu que o mixosporídio em estudo, pertence ao gênero *Henneguya*, no entanto, o valor de *bootstrap* não o permitiu identificar em nível de espécie. Pode-se observar que o microparasito analisado localizou-se em um clado com nove espécies do gênero *Henneguya* apresentando *bootstrap* de 14 e em um subclado sustentado com *bootstrap* de 22. Isto se deve, provavelmente, ao

marcador utilizado (gene ribossomal 18S) que por ser bastante conservado não permitiu resultados interespecíficos. Desta forma, sugere-se o uso de marcadores com altas taxas evolutivas, como o ITS.

Figura 25. Árvore filogenética de *Neighbor-Joining* (NJ) com evolução mínima (EM) e máxima parcimônia (MP), mostrando a relação de *Henneguya* sp. e outros mixosporídios com base na sequência parciais de rDNA 18S. Número de acesso do *GenBank* são identificados, após o nome da espécie. Os números acima dos nós indicam os níveis de confiança de *bootstrap* NJ, EM e MP, respectivamente.



Os trabalhos referentes aos mixosporídios empregaram principalmente caracterizações morfológicas e ultraestruturais (ADRIANO, ARANA; CORDEIRO, 2005; AZEVEDO et al., 2008; NALDONI et al., 2009). Somente a partir do século XX, a caracterização molecular começou a ser empregada nas pesquisas deste Filo (MOLNÁR, et al., 2002; ESZTERBAUER, 2004; MILANI et al., 2010; NALDONI et al., 2011).

As nove espécies de *Henneguya* sp. que constituíram o clado juntamente com a espécie em estudo, foram abordadas em diferentes países como *H. exilis* encontrado no

Mississippi (LIN; HANSON; POTE, 1999) e *H. mutiplasmodialis* que foi registrada em *Pseudoplatystoma* spp. capturados no litoral brasileiro (ADRIANO et al., 2012).

Além da diferença da localização geográfica, os hospedeiros que foram identificados infecção por mixosporídios das espécies de *Henneguya*, pertencem a famílias diferentes. Tais diferenças, não permitem fazer inferências filogenéticas baseando-se nestas informações.

Embora estas espécies tenham se agrupado no mesmo clado, através da análise da distância *p* (Tabela 3) a maior proximidade foi com *Henneguya adiposa* registrado no Mississippi. No entanto, comparando-se morfológica e ultraestruturalmente, esta espécie com a que foi encontrada no presente estudo, não apresentaram similaridades.

Na análise filogenética do presente estudo observam-se algumas espécies do gênero *Myxobolus*. Isto deve-se ao fato da classificação taxonômica do Filo Myxozoa diferenciar estes gêneros através de uma única característica morfológica, a presença de projeções caudais no gênero *Henneguya* e ausência desta estrutura no *Myxobolus* (LOM; DIKOVÀ, 2006).

Kent et al. (2001) assinalam que a ocorrência destes dois gêneros no mesmo clado de origem monofilética sugerem que os esporos de ambos os gêneros possuem capacidade genética para desenvolverem o apêndice caudal. No entanto, esta característica é expressa em algumas espécies. Esta teoria é sustentada pelos estudos de Liu et al. (2011) e Bahri (2008), os quais registraram a ocorrência de novas espécies de *Myxobolus* com projeções caudais semelhantes as encontradas no gênero *Henneguya*.

Tabela 3. Distância  $p$  das amostras analisadas e das sequências disponíveis no *Genbank* para região 18S.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)
(1) <i>Henneguya</i> sp.																	
(2) <i>H. exilis</i>	0.0972																
(3) <i>H. adiposa</i>	0.0988	0.0243															
(4) <i>H. ictaluri</i>	0.0929	0.0080	0.0241														
(5) <i>H. suprabranchiae</i>	0.1035	0.0605	0.0685	0.0623													
(6) <i>H. pellis</i>	0.1009	0.0305	0.0324	0.0343	0.0685												
(7) <i>H. sutherlandi</i>	0.1091	0.0305	0.0283	0.0343	0.0685	0.0161											
(8) <i>Aurantiactinomyxon</i> sp.	0.1171	0.0915	0.0933	0.0952	0.1160	0.0933	0.0974										
(9) <i>A. mississippiensis</i>	0.1024	0.0202	0.0282	0.0181	0.0762	0.0302	0.0423	0.0989									
(10) <i>Myxobolus hakyi</i>	0.1052	0.0839	0.0816	0.0819	0.1085	0.0796	0.0837	0.0982	0.0892								
(11) <i>Myxobolus</i> sp. KU-2010	0.1405	0.1038	0.1123	0.1016	0.1101	0.1041	0.1124	0.1282	0.1093	0.1190							
(12) <i>Myxobolus oliveirai</i>	0.0939	0.0756	0.0733	0.0754	0.0946	0.0734	0.0777	0.0903	0.0813	0.0806	0.1151						
(13) <i>Henneguya</i> sp. EU732599	0.0928	0.0849	0.0828	0.0827	0.1012	0.0890	0.0931	0.0496	0.0943	0.0964	0.1239	0.0718					
(14) <i>Myxobolus</i> sp. WSK-2013	0.1439	0.1201	0.1261	0.1219	0.1262	0.1241	0.1221	0.1279	0.1273	0.1386	0.0858	0.1189	0.1236				
(15) <i>H. multiplasmoidal</i>	0.1144	0.0870	0.0971	0.0827	0.0974	0.0931	0.0992	0.1297	0.0904	0.1254	0.1030	0.1080	0.1196	0.1230			
(16) <i>H. gurlei</i>	0.0926	0.0283	0.0342	0.0322	0.0683	0.0222	0.0302	0.0850	0.0341	0.0813	0.1037	0.0711	0.0807	0.1278	0.0824		
(17) <i>M. machidai</i>	0.1369	0.1282	0.1250	0.1274	0.1223	0.1214	0.1296	0.1272	0.1313	0.1325	0.1238	0.1188	0.1131	0.1425	0.1339	0.1191	
(18) <i>Ceratomyxa shasta</i>	0.2027	0.1766	0.1826	0.1781	0.1870	0.1846	0.1850	0.2082	0.1874	0.1941	0.1936	0.1945	0.2088	0.1961	0.1964	0.1841	0.2210

### 7.3.1.3. *Meglishchia* sp.

Este gênero foi encontrado infectando a vesícula biliar de 5/62 (8,09%) dos exemplares examinados. Foram encontrados, em pequena quantidade, dispersos na bile e principalmente, na parede deste órgão. Os esporos eram arqueados e as cápsulas polares alongadas dispostas axialmente em cada válvula (Figura 26) permitindo a identificação deste gênero, conforme descrito por Azevedo et al. (2011a). Diferentemente de outros gêneros do Filo Mixozoa, existe pouca literatura que descreve a ocorrência deste gênero, dificultando sua discussão.

Na morfometria, os esporos apresentaram comprimento médio de 12,7  $\mu\text{m}$  e largura 4,8  $\mu\text{m}$ . As duas válvulas e cápsulas polares eram simétricas. A última apresentou 4,4  $\mu\text{m}$  de comprimento e 3,28  $\mu\text{m}$  de largura. Azevedo et al. (2011a) identificaram uma nova espécie deste gênero, *Meglitschia mylei*, parasitando o peixe do rio Amazonas *Myleus rubripinnis*, sendo que o esporo tinha 24,6  $\mu\text{m}$  de comprimento, 8,7  $\mu\text{m}$  de largura, as cápsulas polares tinham 2,1  $\mu\text{m}$  de comprimento e largura, medidas que divergem das encontradas no presente trabalho. Logo o tamanho do esporo e da cápsula polar do *Meglishchia* sp. são notadamente menores que *M. mylei*, sugerindo tratar-se de nova espécie deste gênero.

Figura 26. *Brachyplatystoma rousseauxii*. Fotomicrografia de luz com contraste por interferência diferencial (Nomarski/ DIC) de esporos de *Meglishchia* sp. (seta) parasitando vesícula biliar. Esporo com região apical apresentando duas cápsulas polares (CP). Bar. Esc.: 10 $\mu\text{m}$ .



Em decorrência de pouca quantidade de exemplares e baixas cargas parasitárias não foi possível o emprego da técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Em relação à execução de técnicas de biologia molecular foi realizado a clonagem e o sequenciamento. no entanto, conseguiu-se apenas 50 pares de bases, quantidade pequena que impossibilitou, a análise filogenética. Vale ressaltar que até o momento, os trabalhos referentes a este gênero envolvem apenas os aspectos morfológicas e ultra-estruturais, necessitando do desenvolvimento de pesquisas que englobem a caracterização molecular do referido gênero.

#### **7.3.1.4 *Myxobolus* sp.**

Dos exemplares de *B. rousseauxii* avaliados, 13/62 (20,9%) estavam infectados nas brânquias pelo gênero *Myxobolus* cistos esféricos esbranquiçados e ao serem pressionados entre lâmina e lamínula, liberaram inúmeros esporos (Figura 27A). Os esporos tinham formato piriforme, duas cápsulas polares de tamanhos simétricos que ocupavam a região mediana do esporo (Figura 27B).

À análise pela microscopia eletrônica transmissão identificou-se as cápsulas polares (Figura 27C), o esporoplasma com inúmeros esporoplasmosomas globulares, núcleo e cápsula polar (Figura 27D). Corte longitudinal do esporo possibilitou a contagem do número de voltas do filamento polar, em número de oito (Figura 27E).



Figura 27. *Brachyplatystoma rousseauxii*. *Myxobolus* sp.: Fotomicrografia de luz (preparação a fresco): **A.** Filamento branquial (setas) apresentando cisto do parasito (\*) e esporos livres (cabeça de seta) X 40. **B.** Esporos (seta) com observação das cápsulas polares (CP). Bar. Esc.: 20  $\mu$ m. Eletromicrografia de transmissão: **C.** Corte transversal do esporo, mostrando as cápsulas polares (CP). Bar. Esc.: 4  $\mu$ m. **D.** Esporo em corte longitudinal, mostrando cápsula polar (CP), núcleo (N) e esporoplasma (EP). Bar. Esc.: 12  $\mu$ m. **E.** Corte longitudinal de um esporo em maturação, apresentando cápsula polar (CP) com filamento polar (FP) Bar. Esc.: 6  $\mu$ m.

Baseando-se na microscopia de luz e microscopia de transmissão eletrônica foi realizado um desenho esquemático o qual mostra o esporo com cápsulas polares e filamento polar (Figura 28).

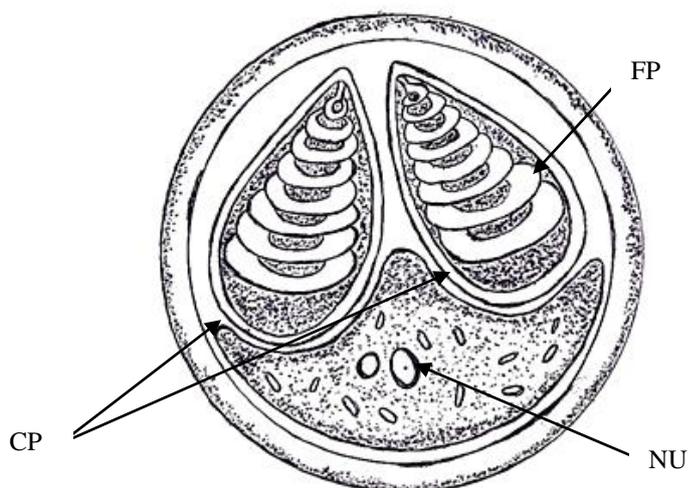


Figura 28. Desenho esquemático de *Myxobolus* sp. parasitando de *B. rousseauxii*, peixe de água estuarina, mostrando a forma e tamanho do esporo, duas cápsulas polares iguais (CP), com 8 filamento polar (FP) e núcleo (NU). Bar. Esc.: 20 $\mu$ m

As características morfológicas e ultraestruturais apresentadas são compatíveis com o gênero *Myxobolus* registrado em diversas regiões do mundo (DIKOVÁ; FIALA; NIE, 2002; CELLERE; CORDEIRO; ADRIANO, 2002; ADRIANO et. al., 2009a; ABDEL-AZEEM; ABDEL-BAKI, 2011; U-TAYNAPUN, PENPRAPAI, 2011).

Para a avaliação morfométrica utilizou-se as principais estruturas que são empregadas para diferenciação com outras espécies, como comprimento e largura do esporo e cápsula polar e número de voltas do filamento polar, conforme a Tabela 5.

Tabela 4. Comparação das dimensões ( $\mu\text{m}$ ) dos esporos de *Myxobolus* spp., parasitando peixes teleósteo do litoral brasileiro.

<b>Espécie</b>	<b>Região</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>CE</b>	<b>LE</b>	<b>CCP</b>	<b>LCP</b>	<b>NVFP</b>	<b>Autores</b>
<i>M.colossomatis</i>	Rio Amazonas	<i>Colossoma macropomis</i>	11,8	6,9	5,3	1,4	7-8	Molnár and Békési (1993)
<i>M. braziliensis</i>	Rio Amazonas	<i>Bunocephalus coracoideus</i>	10,2	5,3	5,3	1,4	9-11	Casal, Matos e Azevedo (1996)
<i>M. desaequalis</i>		<i>Apteronotus albifrons</i>	18,3	11,2	11,2	4,9	11-12	Azevedo, Corral e Matos (2002)
<i>M. testicularis</i>	Teresina-Piauí	<i>Hemiodopsis microlepis</i>	8,6	7,2	3,5	1,7	5-6	Tajdari et al. (2005)
<i>M. insignis</i>	Manaus	<i>Semaprochilodus insignis</i>	14,5	11,3	7,6	4,2	6	Eiras, Molnár e Lu (2005)
<i>M. peculiare</i>	São Paulo	<i>Cyphocharax nagelli</i>	23,1	14,8	10,7	4,4	5	Martins e Onaka (2006)
<i>M. salminus</i>	Pantanal e São Paulo	<i>Salminus brasiliensis</i>	10,1	6,1	4,6	1,7	7-8	Adriano et al. (2009a)
<i>M. metynnis</i>		<i>Metynnis argenteus</i>	13,1	7,8	5,2	3,2	8--9	Casal, Matos e Azevedo (2006)
<i>M. platanus</i>	Rio Grande do Sul	<i>Mugil platanus</i>	10,7	10,8	7,7	3,8	5-6	Eiras et al. (2007)
<i>M. cordeiroi</i>	Pantanal	<i>Zungaro jahu</i>	11,1	7,3	5,4	1,4	5-6	Adriano et al. (2009b)
<i>M. heckelii</i>	Rio Amazonas	<i>Centromochlus heckelii</i>	12,7	6,6	2,9	1,7	4-5	Azevedo et al. (2009b)
<i>M. sciades</i>	Teresina-Piauí	<i>Sciades herzbergii</i>	9,15	4,36	4,44	1,63	9-10	Azevedo et al. (2010)
<i>M. brycon</i>	Pantanal	<i>Brycon hilarii</i>	6,9	4,2	4,2	1,9	8-9	Azevedo et al. (2011b)
<i>Myxobolus</i> sp.	Pará	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	9,9	9,6	5,4	3,4	8	Presente estudo

CE: comprimento do esporo, LE: largura do esporo, CCP: comprimento da cápsula polar, LCP: largura da capsula polar, NVFP: número de voltas do filamento polar.

Na comparação do comprimento do esporo, Azevedo et al. (2010) obtiveram valor aproximado ao encontrado no presente estudo. Tajdari et al. (2005) e Azevedo et al. (2011b) determinaram medidas menores ao achado no presente estudo. Os demais comprimentos encontrados pelos autores citados na tabela eram maiores.

A largura do esporo de *Myxobolus* sp. observado no presente estudo foi superior na maioria dos registros mencionados, exceto nos achados por Eiras, Molnár e Lu (2005), Martins e Onaka (2006) e Eiras et al. (2007) que apresentaram medidas maiores. Em relação ao comprimento da cápsula polar, algumas descrições (TAJDARI et al., 2005; ADRIANO et al., 2009a; AZEVEDO et al., 2010; AZEVEDO et al., 2011b) reportam medidas menores ao achado no presente trabalho. No entanto, a medida foi a mesma encontrada por Adriano et al. (2009) estudando *Zungaro jahu* e aproximou-se do valor mencionado por Casal, Matos e Azevedo (2006) que estudaram *Metynniss argenteus*, peixe proveniente do mesmo estado em que foi desenvolvido o presente estudo.

A largura da cápsula polar de *Myxobolus* sp. teve medidas aproximadas as assinaladas por Casal, Matos e Azevedo (2006) e Eiras et al. (2007), sendo que os primeiros avaliaram peixe do litoral paraense. Eiras et al. (2005) e Martins e Onaka (2005) citam em seus trabalhos larguras maiores e Tajdari et al. (2005), Adriano et al. (2009b), Azevedo et al. (2010) e Azevedo et al. (2011b) acharam larguras menores as mencionadas no presente estudo.

Em relação ao número de voltas do filamento polar, o valor encontrado em *Myxobolus* sp. aproximou-se dos citados por Casal, Matos e Azevedo (2006), Adriano et al. (2009b) e Azevedo et al. (2011b) mas divergiu dos achados por outros autores, como Eiras et al. (2007) e Azevedo et al. (2010).

Apesar de algumas medidas de *Myxobolus* sp. terem se aproximado das relatadas em alguns trabalhos, principalmente o de Casal, Matos e Azevedo (2006) existe uma diferença significativa no comprimento e largura do esporo, o que sugere não ser a mesma espécie. No entanto, somente com a caracterização molecular poderá confirmar se esta espécie encontrada é uma nova espécie ou a mesma identificada pelos referidos autores.

Vale ressaltar que foram realizadas tentativas para chegar-se a caracterização molecular desse *Myxobolus* sp., seguindo-se os protocolos mencionados nas literaturas dos autores que constam da Tabela. Porém, não houve sucesso no sequenciamento através do material purificado e nem na clonagem.

### 7.3.2. *Mugil curema*

#### 7.3.2.1 *Myxobolus* sp.

Foi encontrado *Myxobolus* sp. em 33/58 dos peixes examinados), infectando os filamentos brânquias com vários plasmódio em diferentes estágios de desenvolvimento, incluindo esporos imaturos e maduros (Figura 29A, B e C). Os plasmódios eram esféricos e esbraquiçados, idênticos ao do gênero *Myxobolus* Bütschli, 1882, medindo de 8,1  $\mu\text{m}$  de comprimento total e 8,2  $\mu\text{m}$  de largura.

As duas cápsulas polares têm o formato piriforme, tamanhos simétricos, são alongadas, convergem no ápice do esporo com 6,0  $\mu\text{m}$  de comprimento e 4,0  $\mu\text{m}$  de largura (Figura 29D). O esporoplasma é grande e possui ao redor núcleos e corpos densos (Figura 29E). O filamento polar encontra-se perpendicular ao eixo longitudinal das cápsulas e estava enrolado apresentando 4 a 5 voltas (Figura 29F). Um desenho esquemático com base na microscopia de contraste diferencial e microscopia de transmissão eletrônica apresentam os esporos, capsulas polares, núcleo e o esporoplasma (Figura 30F).

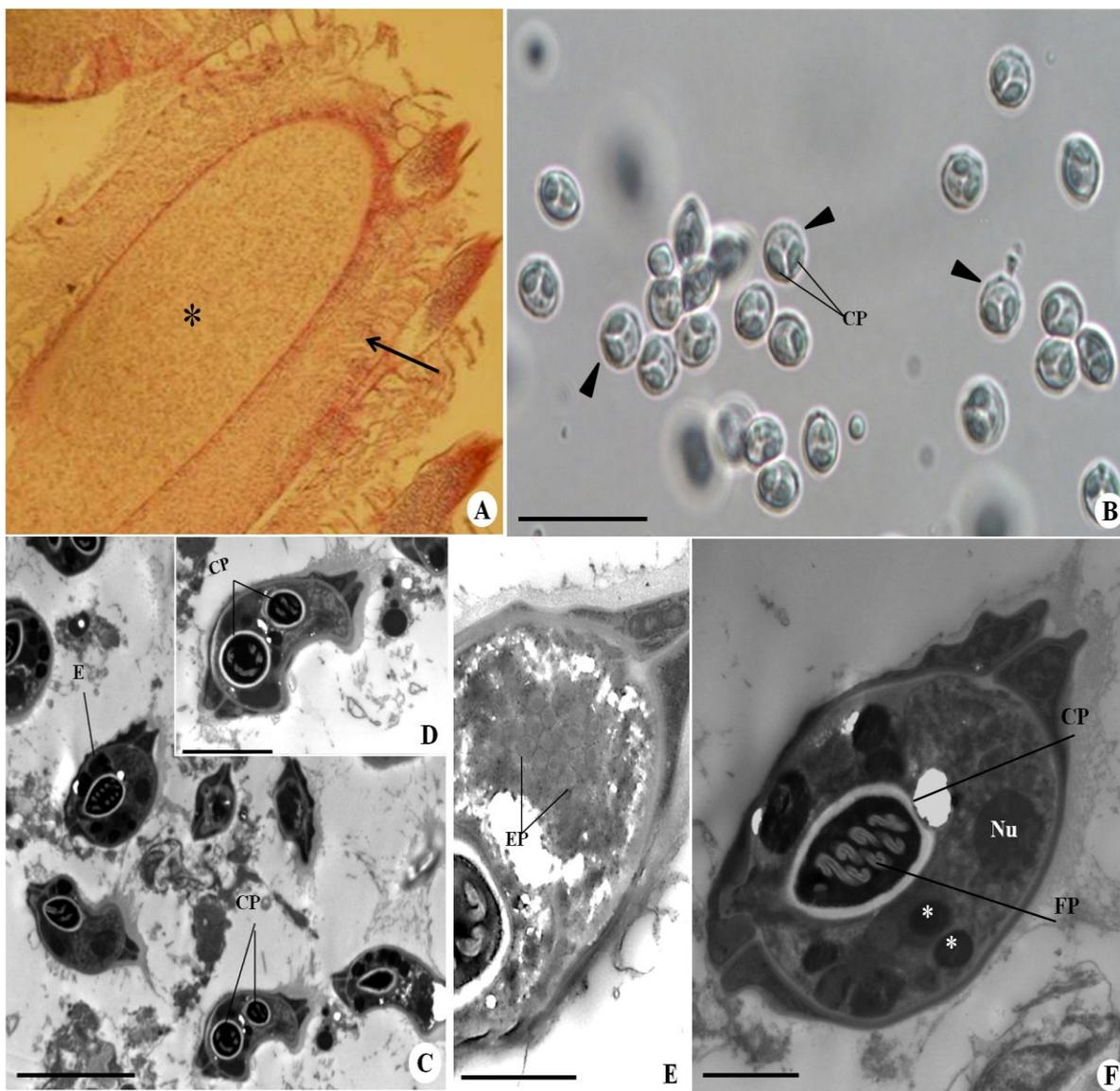


Figura 29. *Mugil curema*. *Myxobolus* sp.: **A.** Corte histológico de brânquia (seta) com cisto (\*) HE X 40. **B.** Contraste por interferência diferencial (Nomarski/ DIC) de esporos (cabeça de seta) com observação das cápsulas polares (CP). Bar. Esc.: 20  $\mu$ m. Eletromicrografia de transmissão: **C.** Esporos (E) seccionados em diferentes níveis, mostrando as cápsulas polares (CP). Bar. Esc.: 5  $\mu$ m. **D.** Corte transversal do esporo com observação de duas cápsulas polares (CP). Bar. Esc.: 2  $\mu$ m. **E.** Corte transversal do esporo mostrando esporoplasmossoma (EP). Bar. Esc.: 1  $\mu$ m. **F.** Visão tangencial do esporo, mostrando cápsula polar (CP), filamento polar (FP), núcleo (N) e corpos densos (\*). Bar. Esc.: 2  $\mu$ m.

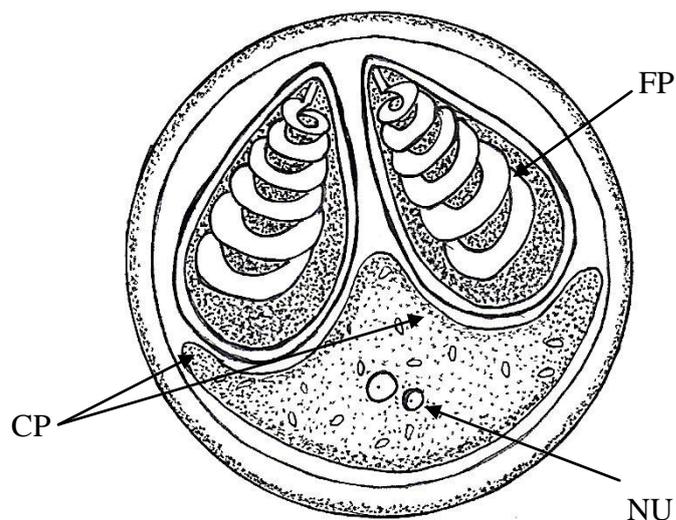


Figura 30. Desenho esquemático de *Myxobolus* sp. parasita de *Mugil curema*, peixe de água estuarina, mostrando a forma e tamanho do esporo, duas cápsulas polares iguais (CP), com 6 filamentos polares (FP), núcleo (NU). Bar. Esc.: 20 $\mu$ m.

Os esporos maduros coletados em *M. curema* apresentaram semelhanças morfológicas e ultraestruturais às do gênero *Myxobolus* (CASAL, MATOS E AZEVEDO, 2002; MATOS, TAJDARI; AZEVEDO, 2005; AZEVEDO et al.,2009b). Este gênero caracteriza-se por possuir esporos elipsoidais, ovóides ou arredondados, com duas válvulas iguais e biconvexas. Além disso, possuem duas cápsulas polares piriformes, esporoplasma binucleado sem projeções (LOM; DYKOVA, 2006).

No presente estudo encontrou-se esporos arredondados, duas cápsulas polares simétricas e piriformes. Vários estudos têm registrado a ocorrência deste gênero de mixosporídios em peixes do litoral brasileiro, infectando principalmente as brânquias, podendo-se então, comparar com a espécie encontrada neste estudo (Tabela 6).

Tabela 5. Comparação das dimensões ( $\mu\text{m}$ ) dos esporos de *Myxobolus* spp., parasitando peixes teleósteo do litoral brasileiro.

<b>Espécie</b>	<b>Região</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>CE</b>	<b>LE</b>	<b>CCP</b>	<b>LCP</b>	<b>NVFP</b>	<b>Autores</b>
<i>M.colossomatis</i>	Rio Amazonas	<i>Colossoma macropomis</i>	11,8	6,9	5,3	1,4	7-8	Molnár and Békési (1993)
<i>M. braziliensis</i>	Rio Amazonas	<i>Bunocephalus coracoideus</i>	10,2	5,3	5,3	1,4	9-11	Casal, Matos e Azevedo (1996)
<i>M. desaequalis</i>		<i>Apteronotus albifrons</i>	18,3	11,2	11,2	4,9	11-12	Azevedo, Corral e Matos (2002)
<i>M. testicularis</i>	Teresina-Piauí	<i>Hemiodopsis microlepis</i>	8,6	7,2	3,5	1,7	5-6	Tajdari et al. (2005)
<i>M. insignis</i>	Manaus	<i>Semaprochilodus insignis</i>	14,5	11,3	7,6	4,2	6	Eiras, Molnár e Lu (2005)
<i>M. peculiaris</i>	São Paulo	<i>Cyphocharax nagelli</i>		14,8	10,7	4,4	5	Martins e Onaka (2005)
			23,1					
<i>M. salminus</i>	Pantanal e São Paulo	<i>Salminus brasiliensis</i>	10,1	6,1	4,6	1,7	7-8	Adriano et al. (2009a)
<i>M. metynnis</i>		<i>Metynnis argenteus</i>	13,1	7,8	5,2	3,2	8--9	Casal, Matos e Azevedo (2006)
<i>M. platanus</i>	Rio Grande do Sul	<i>Mugil platanus</i>	10,7	10,8	7,7	3,8	5-6	Eiras et al. (2007)
<i>M. cordeiroi</i>	Pantanal	<i>Zungaro jahu</i>	11,1	7,3	5,4	1,4	5-6	Adriano et al. (2009b)
<i>M. heckelii</i>	Rio Amazonas	<i>Centromochlus heckelii</i>	12,7	6,6	2,9	1,7	4-5	Azevedo et al. (2009)
<i>M. sciades</i>	Teresina-Piauí	<i>Sciades herzbergii</i>	9,15	4,36	4,44	1,63	9-10	Azevedo et al. (2010)
<i>M. brycon</i>	Pantanal	<i>Brycon hilarii</i>	6,9	4,2	4,2	1,9	8-9	Azevedo et al. (2011b)
<i>Myxobolus</i> sp.	Pará	<i>Mugil curema</i>	8,1	8,2	6,0	4,0	6	Presente estudo

CE: comprimento do esporo, LE: largura do esporo, CCP: comprimento da cápsula polar, LCP: largura da capsula polar, NVFP: número de voltas do filamento polar.

As espécies de *Myxobolus* citadas pelos autores apresentam dimensões distintas dos esporos, sendo que o comprimento dos esporos são maiores que ao encontrado no presente estudo, exceto o de *M. brycon* (AZEVEDO et al., 2011b) que é menor. A largura da cápsula polar de *M. platanus* (EIRAS et al., 2007) aproximou-se de *Myxobolus* sp. e os dois tiveram o mesmo número de voltas. No entanto, não podem ser considerados como a mesma espécie por divergirem nas outras dimensões dos esporos e comprimento da cápsula polar. Diante das diferenças morfológicas e ultraestruturais apresentadas nos exemplares examinados em relação às outras espécies do gênero *Myxobolus*, sugerimos que *Myxobolus* sp. trata-se de uma nova espécie.

#### 7.4. CONCLUSÃO

Os resultados permitiram concluir que:

- 1) As espécies *Ellypsomixa* sp., *Meglishchia* sp. e *Myxobolus* sp. de dourada têm características morfológicas que são compatíveis de novas espécies, necessitando da caracterização molecular para confirmação.
  
- 2) Os aspectos morfológicos observados pelas técnicas em microscopia de luz e eletrônica de transmissão, e a análise molecular são compatíveis de uma nova espécie de *Henneguya* infestando a dourada.
  
- 3) *Myxobolus* sp. encontrado em *Mugil curema* possuem características morfológicas, com caracterização em microscopia de luz e ultraestrutura compatíveis de nova espécie.

## 7.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL - AZEEM, SH.; ABDEL-BAKI. Light and electron microscopic studies on *Myxobolus egyptica* sp. nov. (Myxozoa, Myxosporea), infecting the hornlip mullet *Oedalechilus labiosus* from the Red Sea. **Acta Parasitologica**.n.56, v.3, p. 255–262. 2011.
- ABDEL-GHAFFAR, F.; ABDEL-AZEEM, SH; ABDEL-BAKI; BAYOUMY, E. M.; BASHTAR, A.; QURJESHY, A. MORSEY, K. S.; ALGHAMDY, A.; MEHLHORM, H. Light and electron microscopic study on *Henneguya suprabranchiae* Landsberg, 1987 (Myxozoa: Myxosporea) infecting *Oreochromis niloticus*, a new host record. **Parasitology Research**, v. 103, p. 609-617. 2008.
- ANDREE, K.B.; SZÉKELY, C., MOLNÁR, K.; GRESOVIAC, S. J.; HEDRICK, R. P. Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bivalvidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences. **Journal Parasitology**, v. 85, p. 68-74.1999.
- 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, p. 229–235. 2005.
- ADRIANO, E.A.; ARANA S.; CARRIERO, M.M.; NALDONI, J.; CECCARELLI, P.S.; MAIA, A.A.M. 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. 2009a.
- ADRIANO, E.A.; ARANA S.; ALVES, A. L.; SILVA, M.R.M; CECCARELLI, P.S.; HENRIQUE-SILVA, F.; MAIA, A.A.M.. *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: Morphology, phylogeny and histopathology. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 221–229. 2009b.
- ADRIANO, E. A.; CARRIERO, M. M.; MAIA, A. A.; SILVA, M. R.; NALDONI, J..Phylogenetic and host-parasite relationship analysis of *Henneguya multiplasmodialis* n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland. **Veterinary Parasitology**, v. 185, p. 110-120.2012.
- AZEVEDO, C.; CORRAL, L.; MATOS, E. *Myxobolus desaequalis* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), parasite of the amazonian freshwater fish, *Apteronotus albifrons* (Teleostei,Apteronotidae). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.49, n.6, p.485-488.2002.
- AZEVEDO, C.; MATOS, E.. Fine structure of *Henneguya pilosa* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea), parasite of the Brazilian fish, *Serrasalmus altuvei* (Characidae). **Folia Parasitology**, v. 50, p. 35-40. 2003.
- 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 Microbiology**, v. 55, n.3, p. 229–234. 2008.

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

AZEVEDO, C.; CASAL, G.; MATOS, P.; FERREIRA, I.; MATOS, E. Light and electron microscopy of the spore of *Myxobolus heckelii* n. sp. (Myxozoa), parasite from the Brazilian fish *Centromochlus heckelii* (Teleostei, Auchenipteridae). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 56:589–593. 2009b.

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, n. 2, p. 203–207. 2010.

AZEVEDO, C.; RIBEIRO, M.; SÃO CLEMENTE, S. C.; CASAL, G.; LOPES, L.; MATOS, P.; AL-QURAIHY; MATOS, E. Light and Ultrastructural Description of *Meglitschia mylei* n. sp. (Myxozoa) from *Myleus rubripinnis* (Teleostei: Serrasalminidae) in the Amazon River System. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 525–528. 2011a.

AZEVEDO, C.; 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 Microbiology**, v. 58, n. 2, pp. 88–93. 2011b.

AZEVEDO, C.; VIDEIRA, M.; CASAL, G.; MATOS, P.; OLIVEIRA, E.; L-QURAIHY, 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, p. 490–496. 2013.

BARHI, S. Abnormal forms of *Myxobolus bizert* and *Myxobolus mülleri* (Myxosporea: Bivalvulida) spores with caudal appendages. **Bull. Eur. Assoc. fish Pathol.**, v. 28., n. 6, p. 252–255. 2008.

BARTHEM, R.; GOULDING, M. **The Catfish Connection: Ecology, Migration and Conservation of Amazon Predators**. Columbia University Press: New York, 144p. 1997.

BARTHEM, R. B.; FABRÉ, N. N. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia. In: **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira**. Ed.: Ruffino, M. L. Ibama/ ProVarzea, Manaus, Brazil, p. 17–63. 2004.

BÉKÉSI, L. Evaluation on data of ichthyopathological analysis in the Brazilian northeast. **J. Braz. Assoc. Adv. Sci.**, v. 44, n. 6, p. 400–403. 1992.

CASAL, G.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. Some ultrastructural aspects of *Henneguya striolata* sp. nov. (Myxozoa, Myxosporea), a parasite of the Amazonian fish *Serrasalmus striolatus*. **Parasitology Research**, v. 83, p. 93–95. 1997.

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

CASAL, G.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. Ultrastructural data on the spore of *Myxobolus maculatus* n. sp. (Phylum Myxozoa), parasite from the Amazonian fish *Metynnus maculatus* (Teleostei). **Diseases of Aquatic Organisms**, n.51, p. 107-112, 2002.

CASAL, G.; MATOS, E.; AZEVEDO, C.. Light and electron microscopic study of the myxosporean, *Henneguya friderici* n. sp. from the Amazonian teleostean fish, *Leporinus friderici*. **Parasitology**, n.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 Parasitology**, v. 92, n. 4, p.817–821.2006.

CANNING, E.U. & LOM, J.. The Microsporidia of Vertebrates, **Academic Press**, London. 1986.

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

CELLERE, E. F., CORDEIRO, N. S., ADRIANO, E. A., *Myxobolus absonus* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea) parasitizing *Pimelodus maculatus* (Siluri-formes: Pimelodidae), a South American fresh water fish. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 79–80. 2002.

DIAS, L. N. S. **Cestóides da ordem Trypanorhyncha em peixes de importância comercial capturados no litoral Amazônico**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Pará. 2008.

DIAS, F. J; SÃO CLEMENTE, S. C.; KNOFF, M. *Nematoides anisaquídeos e Cestoides trypanorhyncha* de importância em saúde pública em *Aluterus monoceros* (Linnaeus, 1758) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 19, P. 94-97. 2010.

DIDIER, E.S.; STOVALL, M.E.; GREEN, L.C.; BRINDLEY, P.J.; SESTAK, K.; DIDIER, P.J. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. **Veterinary Parasitology**, v.126, p. 145–166. 2004.

DIDIER, E.; WEISS, L. M. Microsporidioses: current status. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.19, n. 5, p. 485–492.2006.

DIKOVÁ, I.; FIALA, I.; NIE, P. *Myxobolus lentisuturalis* sp, n. (Myxozoa: Myxobolidae) a new-muscle-infecting species from the Prussian carp, *Carassius gibelio* from china. **Folia parasitologica**, v.49, p. 253-258. 2002.

EIRAS, J. C.; MOLNÁR,K.; LU,Y.S. Synopsis of the species of *Myxobolus* Butschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). **Systematic Parasitology**, v. 61, p.1–46. 2005.

EIRAS, J. C.; ABREU, P. C.; ROBALDO, R.; PEREIRA JUNIOR, J. *Myxobolus platanus* n. sp. (Myxosporea, Myxobolidae), a parasite of *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) from Lagoa dos Patos, RS, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.59 n.4 p. 895-898. 2007.

EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C.. *Henneguya caudicula* n. sp. (Myxozoa:Myxosbolidae) a parasite of *Leporinus lacustres* (Osteichthyes, Anostomidae) from the high Paraná River, Brazil, with a Revision of *Henneguya* spp. infecting South America fish.**Acta Protozoologia**. n.48, v.2. 2008.

EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C.. *Henneguya corruscans* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea, Myxobolidae), a parasite of *Pseudoplatystoma corruscans* (Osteichthyes, Pimelodidae) from the Paraná River, Brazil: A morphological and morphometric study. **Veterinary Parasitology**. v.159, p.154–158.2009.

EIRAS, J. C. **Elementos de Ictioparasitologia**. Fundação Engenheiro Antônio de Almeida. Porto. 1994. 339p.

ESZTERBAUER, E.. Genetic relationship among gill-infecting *Myxobolus* species (Myxosporea) of ciprinids: molecular evidence of importance of tissue-specificity. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 58,p. 35–40. 2004.

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

FIALA, I.; BARTOSOVÁ, P.. History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data. **Evolutionary Biology**, v. 10, n. 228. 2010.

HALL, T. BioEdit. Biological sequence alignment editor for Win95/98/ NT/ 2K/ XP. Carlsbad, CA: Ibis Biosciences. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. 2007.

IBAMA. **Estatística da Pesca 2007: Brasil Grandes Regiões e Unidades de Federação**. 2007. Brasília, 2007.

ISAAC, V. J.; ESPÍRITO SANTOS, R. V. & NUNES, J. L. G. A estatística pesqueira no litoral do Pará: resultados divergentes. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**,v.3 ,n. 3,p. 205-213. 2008.

KENT M. L., ANDREE K. B., BARTHOLOMEW J. L., EL-MATBOULI M., DESSER S. S., DELVIN R. H., FEIST S. W., HEDRICK R. P., HOFFMANN R. W., KHATTRA J., HALLETT S. L., LESTER R. J. G., LONGSHAW M., PALENZUELA O., SIDDALL M. E., XIZO C. X. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.48,p. 395–413. 2001.

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

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

LIN, D.; HANSON, L. A.; POTE, L. M.. Small subunit ribosomal RNA sequence of *Henneguya exilis* (Class: Myxosporea) identifies the actinosporean stages from an oligochaete host. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.46, n. 1, p.66–68. 1999.

LIU, Y.; GU, Z.; ZHANG, Y.; ZENG, L.. Redescription and molecular analysis of *Myxobolus shantungensis* Hu, 1965 (Myxozoa: Myxosporea) infecting common carp *Cyprinus carpio haematopterus*. **Parasitology Research**, v.109, p.1619–1623.2011.

LOM, J. ; ARTHUR, J. R, 1989. A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. **Journal Fish Disease**, v.12, p. 151-156. 1989.

LOM J., DYKOVÁ I. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. **Folia Parasitologica**, v. 53,p. 1–36. 2006.

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.

MARTINS, M. L., SOUZA, V.N., MORAES, J.R.E., MORAES, F.R. Gill infection of *Leporinus macrocephalus* Garavello e Britski, 1998 (Osteichthyes: Anostomidae) by *Henneguya leporinicola* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae). Description, Histopathology and Treatment. **Revista Brasileira de Biologia**, v.59, n. 3, p. 527–534. 1999.

MARTINS, M.L., ONAKA, E.M., *Henneguya garavelli* n. sp. and *Myxobolus peculiaris* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) in the gills of *Cyphocharax nagelli* (Osteichthyes: Curimatidae) from Rio do Peixe Reservoir, São José do Rio Pardo, São Paulo, **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 137,p. 253–261. 2006.

MANZI, R. S.; ZAPATA, M. T. G.; SOUZA- JÚNIOR, E. S. Microsporídiöse humana e Importância médica: uma revisão. **Revista de Parasitologia Tropical**, v.32, n. 1, p. 15-32. 2003.

MENEZES, N.A. Guia Prático para conhecimento e identificação das tainhas e paratis (Pisces: Migilidae) do litoral brasileiro. **Revista brasileira de zoologia**, São Paulo, v.2, n.1, p. 1-12,1983.

BRASIL. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. Produção Pesqueira e Aquícola: Estatística 2012, Brasilia, 2012.

MILANIN, T.; EIRAS, J.C.; ARANA, S.; MAIA, A.A.M., ALVES, A.L.; SILVA, M. R.M.; CARRIERO, M.M.; CECCARELLI, P.S.; ADRIANO, E.A. Phylogeny, ultrastruture, histopathology and prevalence of *Myxobolus oliveirai* sp. Nov., a parasite of *Brycon hilarii* (Characidae) in the Pantanal wetland, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.105 ,n.6, p. 762-769. 2010.

- MOLNÁR, K.; BÉKÉSI, L.. Description of a new *Myxobolus* species, *M. colossomatis* n. sp. from the teleost *Collossoma macropomum* of the Amazon River basin. **J. Appl. Ichthyol.**, v. 9, p.57–63.1993.
- MOLNÁR, K.; ESZTERBAUER, E.; SZÉKELY, C.; DÁN, Á.; HARRACH, B.. Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, p. 643.652.2002.
- NALDONI, J.; ARANA,S.; MAIA, A.A.M; CECCARELLI, P.S.; TAVARES, L.E.R., BORGES, F.A; POZO, C.F.; ADRIANO, E.A..*Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial área of gills in the farmed pintado, a South American catfish: Histopathology and ultrastructure.**Veterinary Parasitology**, n. 166, p. 52–59. 2009.
- NALDONI, J.; ARANA,S.; MAIA, A.A.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.
- NELSON, J.S. **Fishes of the world**. John Wiley & Sons Inc. NY, USA. 4rd Edition. 2006. 601p.
- PRADO, S. P. T.; CAPUANO, D. M. Relato de nematóides da família Anisakidae em bacalhau comercializado em Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2006.
- SAITOU, N.; NEI, M.. The neighbor-joining method: a new methors for reconstructing phylogenetic trees **Molecular Biology and Evolution**, p.406-425.1997.
- SANTIAGO, H.; CORRÊA, J. L; TORTELLY, R.; MENEZES, R. C.; MATOS, P.; MATOS, E. Morphology and histopathology of *Calyptospora* sp. (Apicomplexa: Calyptosporidae) in speckled peacock bass, *Cichla temensis* Humboldt, 1821 (Perciformes: Cichlidae), from the Marajó-Açu River, Marajó Island, Brazil. **Parasitology Research**, v. 110, n.6, p. 2569-2572. 2012.
- SANTOS, F.; FERREIRA, F.; ZUANON, J. **Peixes comerciais de Manaus**. Ibrama/AM. Próvarzea. 2006. p.144.
- PARÁ. **Secretaria de Pesca e Aquicultura do Estado do Pará**. Estatística e desembarque pesqueiro do estado do Pará. Pará, 2008.
- SILVA, M. A.; ARAÚJO, F. G. Distribuição e abundância de tainhas e paratis (Osteichthyes, Mugilidae) na Baía Sepetiba, Rio de Janeiro, **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v.17, n.2, p. 473-480.2000.
- SZPILMAN, M. **Peixes Marinhos do Brasil: Guia prático de identificação**. Inst. Ecol.Aqualung. Rio de Janeiro, 2000. 288p.
- SMOTHERS, J. F.; VONDOHLEN, C. D.; SMITH, L. H.; SPALL, R. D. Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. **Science**, v. 265, p.1719-1721.1994.

TAJDARI, J.; MATOS, E.; MENDONÇA, I.; AZEVEDO, C. Ultraestrutura, morphology of *Myxobolus testicularis* sp. n, parasite of the testis of *Hemiodopsis microlepis* (Teleostei: Hemiodontidae) from the NE of Brazil. **Acta Protozoology**, n. 44, p.377 – 384. 2005.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S.. MEGA 5: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods**. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, n.10, p. 2731-2739.2011.

U-TAYNAPUN, K.; PENPRAPAI,N. *Myxobolus supamattayai* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) from Thailand parasitizing the scale pellicle of wild mullet (Valamugil seheli). **Parasitology Research**,v.109,p.81–91.2011.

VÁZQUEZ-LÓPEZ, C.; ARMAS-SERRA, C.; RODRÍGUEZ-CAABEIRO, F. *Gymnorhynchus gigas*: taxonomia, morfologia, biología y aspectos sanitários. **Analecta Veterinaria**. n. 21, v. 2, p.38-49. 2001.

VITA, P.; CORRAL, 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.

WEBER, R., B. SAUER, M. A. SPYCHER, P. DEPLAZES, R. KELLER, R. AMMANN, J. BRINER, AND R. LÜTHY. Detection of *Septata intestinalis* in stool specimens and coprodiagnostic monitoring of successful treatment with albendazole. **Clinical Infect Disease**, v.19, p.342–345. 1994.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento de consumo de pescado no país torna importante o estudo das enfermidades ictioparasitárias. O conhecimento das espécies que parasitam estes hospedeiros, suas características morfológicas, filogenéticas e patológicas são requisitos que corroboram para o esclarecimento dos prejuízos econômicos, danos aos hospedeiros e possíveis perigos a saúde pública.

Os hospedeiros estudados neste trabalho são importantes espécies de valor econômica, comercializados em vários estados brasileiros, além de serem bastante consumidos pela população ribeirinha do estado do Pará, tornando necessário a realização de estudos complementares como a relação parasito-hospedeiros e aspectos epidemiológicos.

A análise filogenético dos microparasitos encontrados em *B. rousseauxii* e *M. curema* deve ser aprimorados para atingi a filogenia destas espécies parasitárias, visto serem prováveis novas espécies o que contribuirá para aumentar o acervo do conhecimento desses microparasitos e no desenvolvimento de futuras pesquisas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-AZEEM, S. H.; ABDEL-BAKI. Light and electron microscopic studies on *Myxobolus egyptica* sp. nov. (Myxozoa, Myxosporea), infecting the hornlip mullet *Oedalechilus labiosus* from the Red Sea. **Acta Parasitologica**, n.56, v.3, p. 255–262. 2011.
- ADRIANO, E.A.; et al.. 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. 2009.
- ALBUQUERQUE, M.C.; BRASIL-SATO, M. C. First report of *Calyptospora* sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) inforage characid fish from the Três Marias Reservoir, São Francisco Basin, Brazil. **European Journal of Protistology**, v. 46, p.150-152. 2010.
- AMATO, J.G.P.; AMATO, V.S.; AMATO NETO, V. Aplicação do método de coloração tricrômica em fezes diarréicas de infectados pelo HIV, para pesquisa de microsporídios. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, p.277-283.1999.
- AZEVEDO, C.; MATOS, P.; MATOS, E. Morphological data of *Calyptospora spinosa* n. sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) Parasite of *Crenicichla lepidota* HECKEL, 1840 (Teleostei) from Amazon River. **European Journal of Protistology**, v. 29, pp. 171-175. 1993.
- AZEVEDO C, MATOS P, MATOS E. Ultrastructural data on sporogony of the coccidian parasite *Calyptospora spinosa* from the liver of the Amazonian fish, *Crenicichla lepidota* Heckel. **Journal Fish Disease**, v.18, p.475-479. 1995.
- AZEVEDO, C.; MATOS, E. *Henneguya malabarica* sp. nov. (Myxozoa, Myxobolidae) in the Amazonian fish *Hoplias malabaricus*. **Parasitology Research**, n.82, p.222–224. 1996.
- AZEVEDO, C., CORRAL, L. & MATOS, E. Light and ultrastructural data on *Henneguya testicularis* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae), a parasite from the testis of the Amazonian fish *Moenkhausia oligolepis*. **Systematic Parasitology**, v.37, n.1, p.11-14. 1997.
- AZEVEDO, C.; MATOS, E. Fine structure of the Myxosporean, *Henneguya curimatan*. sp., parasite of the Amazonian fish *Curimata inornata* (Teleostei, Curimatidae). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 197-200. 2002a.
- 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, 2002b.
- AZEVEDO, C.; CORRAL, L.; MATOS, E. *Myxobolus desaequalis* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), parasite of the amazonian freshwater fish, *Apteronotus albifrons* (Teleostei, Apteronotidae). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.49, n.6, p.485-488. 2002.
- AZEVEDO, C.; MATOS, E. *Amazonspora hassarn*. gen. and n. spp. (Phylum Microsporida, fam. Glugeidae), a parasite of the Amazonian fish, *Hassar orestis* (Fam. Doradidae). **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 336-341. 2003a.

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

AZEVEDO, C.; et al.. 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 Microbiology**, v. 55, n.3, p. 229–234. 2008.

AZEVEDO, C.; et al.. Fine structure of *Henneguya hemiodopsis* sp. n.(Myxozoa), a parasite of the gills of the Brazilian teleostean fish *Hemiodopsis microlepes* (Hemiodontidae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 975–979. 2009.

AZEVEDO, C.; et al.. 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, n.2, p.203-207. 2010.

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

AZEVEDO, C.; et al.. Ultrastructure of *Myxobolus brycon* n. sp. (Phylum Myxozoa), Parasite of the Piraputanga Fish *Brycon hilarii* (Teleostei) from Pantanal (Brazil). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 88–93. 2011b.

AZEVEDO, C.; et al.. *Henneguya torpedo* sp. nov.(Myxozoa), a parasite from the nervous system of the Amazonian teleost *Brachyhypopomus pinnis caudatus* (Hypopomidae). **Diseases of Aquatic Organisms**,v. 93,p. 235-242. 2011c.

AZEVEDO, C.; et al.. Light and Ultrastructural analysis of *Myxobolus insignis* (Myxozoa), infecting the Amazonian Fish *Semaprochilods insignis* (Prochilodontidae).**Zootaxa**, n. 3182, p. 51-56. 2012.

BARRASA, B.; et al.. *Henneguya curvata* sp. n. (Myxosporea:Myxosbolidae) parasitizing the gills of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae: Serrasalminae), a South American freshwater fish. **Folia Parasitologica**. n. 50, p.151-153. 2003a.

BARRASA, B.; CORDEIRO, N. S.; ARANA, S. A New Species of *Henneguya*, a Gill Parasite of *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae) from Brazil, with Comments on Histopathology and Seasonality. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 98, n. 6, p -761-765. 2003b.

BARTHEM, R.; GOULDING, M. **The Catfish Connection: Ecology, Migration and Conservation of Amazon Predators**. Columbia University Press: New York, 144p. 1997.

BARTHEM, R.B.;FABRÉ, N.N. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia. In: **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira**. Ed.: Riffino, M.L. Ibama/ ProVarzea, Manaus, Brazil, p.17-63. 2004.

BATISTA, V. S.; ISSAC,V. J.; VIANA, J. P. "Exploração e manejo dos recursos pesqueiros

Da Amazônia".In: Rufino, M. L. (ed.). **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira**. ProVárzea. Manaus. IBAMA. 2004. 268 p.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C. **Manual de Técnicas para histologia normal e patológica**. Antonio Geraldo de Freitas Neto. São Paulo. EDART. Ed, da Universidade de São Paulo.1976. 241p.

BELOVA, L. M.; KRYLOV, M. V. Specificity of coccidia of fishes (Sporozoa, Coccidiida).Annual Reports of the Zoological Institute RAS, 2000. Disponível em: <http://www.zin.ru/annrep/2000/02.html>. Acesso em: 22 de março 2012.

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

BÉKÉSI, L. Evaluation on data of ichthyopathological analysis in the Brazilian northeast. **J. Braz. Assoc. Adv. Sci.**, v.44, n.6, p.400-403. 1992.

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

BIGLIARDI, E.; GATTI, S.; SACCHI, L. Ultrastructure of microsporidian spore wall: The *encephalitozoon cuniculi* exospore. Ital. **Journal Zoology**, v. 6, p. 1-5. 1997.

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

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

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

BRASIL, P.; et al. - Intestinal microsporidiosis in HIV-positive patients with chronic unexplained diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil: diagnosis, clinical presentation and follow-up. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, p. 97-102, 1996

BRASIL, P.; BONFIM DE LIMA, D.; MOURA, H. Microsporidiose humana na síndrome de imunodeficiência adquirida. **Revista da Associação Médica do Brasil**, v. 43, n. 3, p. 254-64. 1997.

BRASIL, P.; PAIVA, D.D.; LIMA, D.B. A 3-year follow-up of a Brazilian AIDS patient with protracted diarrhea caused by *Enterocytozoon bieneusi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. S. Paulo, v. 40, p. 215-218. 1998.

BRASIL, P.; et al.. Clinical and diagnostic aspects of intestinal microsporidiosis in hiv-infected Patients with chronic diarrhea in Rio de Janeiro, brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, p. 299-304, 2000.

CANNING, E.U.; LOM, J.. The Microsporidia of Vertebrates, **Academic Press**, London.1986.

CASAL, G.; MATOS E, AZEVEDO C. Ultrastructural data on the life cycle stages of *Myxobolus braziliensis* n. sp. parasite of an Amazonian fish. **European Journal of Protistology**. v. 32, p. 123–127.1996.

CASAL, G.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. Ultrastructural data on the spore of *Myxobolus maculatus* n. sp. (Phylum Myxozoa), parasite from the Amazonian fish *Metynnus maculatus* (Teleostei). **Diseases of Aquatic Organisms**, n.51, p. 107-112, 2002.

CASAL, G.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. Light and electron microscopic study of the myxosporean, *Henneguya friderici* n. sp. from the Amazonian teleostean fish, *Leporinus friderici*. **Parasitology**, n.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 Parasitology**, v. 92, n. 4, p.817–821.2006.

CASAL, G.; et al.. Morphological and Ultrastructural Redescription of *Calyptospora serrasalmi* (Apicomplexa: Calyptosporidae): a parasite found in two new species of the genus *Serrasalmus* and its pathological activities. **Brazilian Journal Morphology Science**, v. 20, p.11-16. 2007.

CASAL, G.; et al.. 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. 2008.

CASAL, G.; et al.. Morphological and genetical description of *Loma psittaca* sp. n. isolated from the Amazonian fish species *Colomesus psittacus*. **Parasitology Research**, v.105, n.5, p.1261-71.2009.

CASAL, G. **Microsporidioses e Mixosporidioses da ictiofauna Portuguesa e Brasileira: Caracterização Ultraestutural e Filogenética**. Tese de doutorado- Universidade do Porto. 2010.

CAVALIER-SMITH, T. Kingdom Protozoa and Its 18 Phyla. **Microbiological Reviews**, v. 4, n. 57, p. 953-994.1993.

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

CAVALIER-SMITH, T.Only six kingdoms of life.Proceedings of the Royal Society **Proc. R. Soc. Lond. B**. n. 271,p. 1251–1262.2004.

CERDEIRA, R. G. P.; et al.. Consumo de pescado e outros alimentos pela população ribeirinha do Lago Grande de Monte Alegre, PA. Brasil". **Acta Amazônica**. v. 27, n.3, p. 213-228. 1997.

CELLERE, E. F., CORDEIRO, N. S., ADRIANO, E. A., *Myxobolus absonus* sp. n. (Myxozoa: Myxosporidia) parasitizing *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae), a South American freshwater fish. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.97, p. 79–80. 2002.

CHEUNG, P.J; NIGRELLI, R.F.; RUGGIERI, G.D. *Calyptospora serrasalmi* sp. nov. (Coccidia: Calyptosporidae) from liver of the black piranha, *Serrasalmus niger* Schomburgk. **Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences**, v.4, p. 54-57. 1986.

COSTA, T.L.; et al.. Diagnóstico Clínico e Laboratorial da Toxoplasmose. **NewsLab**, ed. 85. 2007.

DIDIER, E.S.; et al.. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. **Veterinary Parasitology**, v.126, p. 145–166. 2004.

DIDIER, E.; WEISS, L. M. Microsporidiosis: current status. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.19, n. 5, p. 485–492. 2006.

DIKOVÁ, I.; LOM, J. Fish coccidian: critical notes on life cycles, classification and pathogenicity. **Journal of fish diseases**, v.4, p.487-505.1981.

DIKOVÁ, I.; LOM, J. Histopathology of *Kabatana arthuri* (Microsporida) infection in sutchi catfish, *Pangasius sutchi*. **Folia Parasitologica**, v. 47, p.161-166. 2000.

DIKOVÁ, I.; FIALA, I.; NIE, P. *Myxobolus lentisuturalis* sp, n. (Myxozoa: Myxobolidae) , a new-muscle-infecting species from the Prussian carp, *Carassius gibelio* from china. **Folia Parasitologica**, v.49, p. 253-258. 2002.

DIAS, L. N. S. **Cestóide da ordem Trypanorhyncha em peixes de importância comercial capturados no litoral Amazônico**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Pará. 61p.,2008.

DWORKIN, M.S.; et al.. Prevalence of intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus infected patients with diarrhea in major United States Cities. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, n.49, v.6, p.339-342.2007.

DUBREMETZ, J. F; et al.. Apical organelles and host cell invasion by Apicomplexa. **International Journal for Parasitology**.v.28, p. 1007-1013.1998.

DUSZYNSKI, D. W.; SOLANGI, M. A.; OVERSTREET, R. M. A new and unusual eimerian (Protozoa: Eimeriidae) from the liver of *Gulf killifish*, *Fundulus grandis*. **Journal Wild life Diseases**, v. 15, p. 543-552. 1979.

DUSZYNSKI, D.W.; COUCH, L. J.; UPTON, S. J. 2000. *The coccidian genus Calyptospora* Disponível em: <<http://www.k-sate.edu/parasitology/worldcoccidia/CALYPTOSPORA?>>. Acesso em: 3 de março. 2012.

EIRAS, J. C. **Elementos de Ictioparasitologia**. Fundação Engenheiro Antônio de Almeida. Porto. 1994. 339p.

EIRAS, J.C.; MOLNAR, K.; LU, Y.S. Synopsis of the species of *Myxobolus* Butschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporae: Myxobolidae). **Systematic Parasitology**, v. 61, p.1–46, 2005.

EIRAS, J. C.; et al.. *Myxobolus platanus* n. sp. (Myxosporae, Myxobolidae), a parasite of *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) from Lagoa dos Patos, RS, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 59, n.4, p. 895-898, Belo Horizonte, 2007.

EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. *Henneguya caudicula* n. sp. (Myxozoa: Myxosporidae) a parasite of *Leporinus lacustris* (Osteichthyes, Anostomidae) from the high Paraná River, Brazil, with a Revision of *Henneguya* spp. infecting South America fish. **Acta Protozoologica**, v.2, n.48, 2008.

EIRAS, J. C; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. *Henneguya corruscans* n. sp. (Myxozoa, Myxosporae, Myxobolidae), a parasite of *Pseudoplatystoma corruscans* (Osteichthyes, Pimelodidae) from the Paraná River, Brazil: A morphological and morphometric study. **Veterinary Parasitology**, n.159, p. 154-158. 2009.

EIRAS, J.C.; MONTEIRO, C.M.; BRASIL-SATO, M.C. *Myxobolus franciscoi* sp. nov. (Myxozoa: Myxosporae: Myxobolidae), a parasite of *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii: Prochilodontidae) from the Upper São Francisco River, Brazil, with a revision of *Myxobolus* spp. From South America. **Zoologia**, n. 27, v. 1, p. 131-137. 2010.

FABRÉ, N. N.; DONATO, J. C.; ALONSO, J. C. Bagres de la Amazonia Colombiana. Um recurso sin Fronteiras. **Instituto Amazônica de Investigaciones Científicas**. SINCH. Bogotá, D. F. 253p. 2000.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares: aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. EMBRAPA: Planatina, Distrito Federal, 1º edição, 2007.

FELSENSTEIN, J. **Inferring Phylogenies**. Associados de Sinauer, Sunderland, Massa. P.. 580p., 2004.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa: Distrito Federal, 3º edição, 1998.

FEIJÓ, M.M.; et al.. Light and scanning electron microscopy of *Henneguya arapaima* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) and histology of infected sites in pirarucu (*Arapaima gigas*: Pisces: Arapaimidae) from the Araguaia River, Brazil, **Veterinary Parasitology**. v. 157, p.59-64. 2008.

FRAZEN, C.; MÜLLER, A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. **Clinical Microbiology Review**, v. 12, p. 243-285. 1999.

FOURNIE, J.W; HAWKINS, W.E, OVERSTREET, R .M. *Calyptospora empristican*. sp. (Eimeriorina Calyptosporidae) from the liver of the starhead topminnow, *Fundulus notti*. **Journal Protozoology**. v. 32, pp. 542-547. 1985.

GALLETI, S. R. Introdução à microscopia eletrônica. **Biológico**, São Paulo, v.65, n.1/2, p.33-35,. 2003.

GONÇALVES, E. M.N; et al.. Microsporidiosis in a Brazilian university hospital. Case report. **Revista do Instituto de Medicina tropical**, v. 48, n.6,p.351-352. 2006.

IBAMA. **Estatística da Pesca 2007: Brasil grandes regiões e unidades de Federação**. 2007, Brasília, 2007.

ISAAC, V. J.; ESPÍRITO SANTOS, R. V.; NUNES, J. L. G. A estatística pesqueira no litoral do Pará: resultados divergentes. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v.3 ,n. 3,p. 205-213.2008.

KAUR, H.; SINGH, R. Two new species of *Myxobolus* (Myxozoa: Myxosporea: Bivalvulida) infecting Indian freshwater fishes in Punjab Wetlands (India). **Parasitology Research**. 2010b.

KAUR, H.; SINGH, R. Two new species of *Myxobolus* (Myxosporea, Bivalvulida) from the Indian major carp *Labeorohita*(Ham.) **Protistology**, v. 6, n.4, p. 264–270, 2010b.

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

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.

KINKELIN, P.; MICHEL, C.; GHITTINO, P. **Tratado de las enfermedades de los peces**. Editora Acribia, Zaragoza, Espanha. 1991.

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

LANG-UNNASCHA, N.; et al.. Plastids are widespread and ancient in parasites of the phylum Apicomplexa. **International Journal for Parasitology**, n. 28, p.1743-1754. 1998.

LEE, S. C; et al.. Microsporidia Evolved from Ancestral Sexual Fungi Current. **Biology**, v. 18, p. 1675-1679. 2008.

LYCKE, E., CARLBERG, K., AND NORRBY, R. Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the penetration-enhancing factor of *Toxoplasma*. **infect immunity journal**, v.11,p.853–861. 1975.

LOM, J.; DYKOVÁ I. Apicomplexans (Phylum Apicomplexa Levine, 1970). In: *Protozoan Parasites of Fishes. Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, v. 26 (Lom J, Dyková I, eds). p. 87-123. Elsevier, Amsterdam. 1992a.

LOM, J.; DYKOVÁ, I. Protozoan Parasites of Fishes. **Amsterdam, Elsevier**, 315 p. 1992b.

LOM, J.; A.; DYKOVÁ, I. Microsporidian xenomas in fish seen in wider perspective. **Folia Parasitology**, v. 52, p. 69-81. 2005.

LOM, J.; DYKOVÁ I. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. **Folia Parasitologica**, v. 53, p. 1–36. 2006.

LUQUE, J. L. B. Biologia, epidemiologia e controle de Parasitos de Peixes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, supl.1. 2004.

LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of pathology**. Third Edition. American Registry of pathology. Edition. 258p. 1968.

MAGALHÃES, N.; et al.. 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.

MAÍLLO-BELLÓN, P.A.; MARQUES, A.; GRACIA-ROYO, M.P. Myxosporean Infection of *Grey Mullet* in the Ebro Delta: Identification and Ultrastructure of *Myxobolus ichkeulensis* Bahri and Marques, 1996 infecting the gills of *Mugil cephalus* L. **Acta Protozoology**. v.50, p.65-69. 2011.

MANZI, R. S.; ZAPATA, M. T. G.; SOUZA JÚNIOR, E. S. Microsporídiase humana e Importância médica: uma revisão. **Revista de Parasitologia Tropical**, v.32, n. 1, p. 15-32. 2003.

MARTINS, M. L.; et al.. Pathology and behavioral effects associated with *Henneguya* sp. (Myxozoa: Myxobolidae) infections of captive pacu *Piaractus mesopotamicus* in Brazil. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 28, p. 297–300. 1997.

MARTINS, M. L.; et al.. Gill infection of *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1998 (Osteichthyes: Anostomidae) by *Henneguya leporinicola* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae). Description, Histopathology and Treatment. **Revista Brasileira de Biologia**, v.59, n. 3, p. 527–534. 1999.

MATOS, E.; et al.. Ultraestrutura de Protozoários parasitas de peixes da região Amazônica. **Acta amazônica**, v. 29, n. 4, p. 575-585. 1999.

MATOS, E.; et al.. Dados ultraestruturais de microsporídios (Phylum Microsporidia) da fauna ictiológica da Região Amazônica. **Revista de Ciências Agrárias**, n. 39. p. 95-108. 2003a.

MATOS, E.; et al.. Microrganismos Parasitos de Animais Aquáticos da Amazônia. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T., TAKEMOTO, R. M., LIZAMA, M. A. P. **Sanidade de organismos aquáticos**. Editora Varela, São Paulo, Brasil, 158-178p. 2004a.

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. 2004b.

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.

MATOS, E. R. **Caracterização de aspectos morfológicos e ultraestruturais do ciclo de vida de microsporídios encontrados em peixes da região amazônica**. Belém, 2007. Tese de Doutorado- Universidade Federal do Pará. 135p. 2007.

MARTINS, M.L.; et al..*Henneguya* sp. (Myxozoa: Myxobolidae) in *Pimelodus maculatus* (Osteichthyes: siluridae) from Volta Grande Reservoir, Minas Gerais, Brasil.**Boletim do Instituto de Pesca**. v. 30, n.1, p. 1-7. 2004.

MARTINS, M.L., ONAKA, E.M., *Henneguya garavelli* n. sp. and *Myxobolus peculiaris* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) in the gills of *Cyphocharax nagelli* (Osteichthyes: Curimatidae) from Rio do Peixe Reservoir, São Jose´ do Rio Pardo, São Paulo, **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 137,p. 253–261. 2006.

MATTHEWS, R. A.; MATTHEWS, B. F. Cell and tissue reactions of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) to *Tetramicra brevifilum*gen.n.,sp.n. (Microspora). **Journal Fish Diseases**, v.2, p.495-515. 1980.

MENEZES, N.A. Guia Prático para conhecimento e identificação das tainhas e paratis (Pisces:Migilidae) do litoral brasileiro. **Revista brasileira de zoologia**, São Paulo, v.2, n.1, p. 1-12,1983.

MILANIN, T.; et al.. Phylogeny, ultrastruture, histopathology and prevalence of *Myxobolus oliveirai* sp. Nov., a parasite of *Brycon hilarii* (Characidae) in the Pantanal wetland, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105,n.6, p. 762-769. 2010.

McCLELLAND, R. S.; MURPHY, D. M.; CONE, D. K. Report of spores of *Henneguya salminicola* (Myxozoa) in human stool specimens: possible source of confusion with human spermatozoa.**Journal of clinical microbiology** y, v.35, p. 2815–2818. 1997.

MONCADA, L. I.; et al. *Myxobolus* sp., Another Opportunistic Parasite in Immunosuppressed Patients? **Journal of clinical microbiology**,p. 1938–1940. 2001.

MOLNÁR, K.; BÉKÉSI, L.. Description of a new Myxobolus species, *M. collossomatis* n. sp. from the teleost *Collossoma macropomum* of the Amazon River basin. **J. Appl. Ichthyol.**, v. 9, p.57–63.1993.

MOLNÁR, K.; et al.. Myxozoan pathogens in cultured Malaysian fishes. Myxozoan infections of the sutchi catfish *Pangasius hypophthalmus* in fresh water cage cultures. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.68, p. 209–218. 2006.

BRASIL. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. Produção Pesqueira e Aquícola: Estatística 2008 e 2009, Brasília, 2009.

NALDONI, J.; et al.. *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epitelial área of gills in the farmed pintado, a South American catfish: Histopathology and ultrastructure. **Veterinary Parasitology**, n. 166, p. 52–59, 2009.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. John Wiley & Sons Inc. NY, USA. 4rd Edition. 601p. 2006.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. Editora atheneu, 10ª edição, São Paulo. 2002.

OLIVEIRA, M.F.T; et al.. *Calyptospora funduli* (Apicomplexa, Calyptosporidae) in the liver of the Gulf toadfish, *Opsanus beta*. **J. Helminthol.** v.60, p. 273-277. 1993.

OVERSTREET, R. M.; OGLE, J. T. Preliminary observations of the effect of *Eimeria funduli* (Protozoa: Eimeriidae) on the Gulf killifish *Fundulus grandis* and its potential impact on the killifish bait industry. **Gulf Research Reports**, v. 7, p. 87-88. 1981.

OVERSTREET, R.M; HAWKINS, W.E; FOURNIE, J.W.. The coccidian genus *Calyptospora* n. g. and family Calyptosporidae n. fam. (Apicomplexa), with members infecting primarily fishes. **Journal Protozoology**. v.31, p. 332-339. 1984.

PRADO, S. P. T.; CAPUANO, D. M. Relato de nematóides da família Anisakidae em bacalhau comercializado em Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2006.

PERKINS, F.O. ‘Sporozoa’: Apicomplexa, Microsporidia, Haplosporidia, Paramyxia, Myxosporidia and Actinosporidia. In: Microscopic Anatomy of Invertebrates (*Protozoa*) (Harrison, F. W. & Corliss, J. O., Eds.), v. 1, **Wiley-Liss Inc.**, New York, NY, p. 261-331. 1991.

RIVAS, L. R. Synopsis of knowledge on the taxonomy, biology, distribution and fishery of the Gulf of Mexico mullets (Pisces: Mugilidae), in M. Flandorfer L. Skupien, eds., "Proc." Work. Pot. Fish. **Research Northern Gulf of Mexico**. p. 34-53. 1980.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. Mr. bayers 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatic, Oxford University**, v. 19, n.12, p.1572-174. 2003.

SANTOS, F.; FERREIRA, F.; ZUANON, J. **Peixes comerciais de Manaus**. Ibtnama/AM. Próvarzea. 2006. p.144.

PARÁ. **Secretaria de Pesca e Aquicultura do Estado do Pará. Estatística e desembarque pesqueiro do estado do Pará**. Pará, 2008.

SERRA- FREIRE, N. M.; **Planejamento e análise de pesquisas parasitológicas**. Niterói, Rio de Janeiro. Ed. Eduff. 2002.

SILVA, M. A.; ARAÚJO, F. G. Distribuição e abundância de tainhas e paratis (Osteichthyes, Mugilidae) na Baía Sepetiba, Rio de Janeiro, **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v.17, n.2, p. 473-480. 2000.

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

SOLANGI, M. A.; OVERSTREET, R. M. Biology and pathogenesis of the coccidium *Eimeria fundul* infecting killifishes. **Journal of Parasitology**, v. 66, p. 513-526. 1980.

SOUZA, W. ; et al.. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*, **Scientia Medica**, Porto Alegre, v.20, n.1, p.131-143. 2010.

SZPILMAN, M. **Peixes Marinhos do Brasil: Guia prático de identificação**. Inst. Ecol.Aqualung. Rio de Janeiro. 2000. 288p

THATCHER, V. E.; NETO, J. B. **Amazon Fish Parasites**. 2 ed. Sofia; Pensoft. 2006. 497p.

TAJDARI, J.; et al..Ultraestrutura, morphology of *Myxobolus testicularis* sp. n. parasite of the testis of *Hemiodopsis microlepis* (Teleostei: Hemiodontidae) from the NE of Brazil. **Acta Protozoology**, n. 44, p.377 – 384. 2005.

U-TAYNAPUN, K.; PENPRAPAI,N. *Myxobolus supamattayai* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) from Thailand parasitizing the scale pellicle of wild mullet (*Valamugilseheli*).**Parasitology Research**,v. 109,p. 81–91.

VAN DRIESCHE, R. G.; BELLOWS JR., T. S. **Biological Control**.Chapman & Hall.539 p, 1996.

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

VÁZQUEZ-LÓPEZ, C.; ARMAS-SERRA, C.; RODRÍGUEZ-CAABEIRO, F. *Gymnorhynchus gigas*: taxonomia, morfologia, biologia y aspectos sanitários. **Analecta Veterinaria**. n. 21, v. 2, p.38-49. 2001.

VELASCO, M.; et al.. Morfologia e nova ocorrência de um coccídio hepatopancreático parasita de peixe amazônico. **Revista de Ciências Agrarias**, v. 55, n. 3, p. 231-235. 2012.

VILLELA, E.V.; et al.. Clinical and Diagnostica spects of intestinal microsporidiosis in HIV infected patients with chronic diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, n. 42, v.6, p.299-304.2000.

VITA, P.; et al.. Ultrastructural aspects of the myxosporean *Henneguya astyanax*n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae), a parasite of th eAmazonian teleost *Astyanax keithi*(Characidae). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 53, p. 55–60, 2003.

YOKOYAMA, H., LEE, S.J.; BELL, A. Occurrence of a new microsporidian in the skeletal muscle of the flying fish *Cypseluruspinni barbatus japonicas* (Exocoetidae) from Yakushima, Japan. **Folia Parasitológica**, v. 49, p. 9–15. 2002.

ZHAO, Y.; et al.. Description of a new of *Myxobolus* (Myxozoa: Myxobolidae) based on morphological and molecular data. **Journal Parasitology**, v. 94, n.3,p. 737-742, 2008.

WASSON, K.; PEPPER, R.L.Mammalian Microsporidiosis.**Veterinary Pathology**.v.37,p. 113. 2000.

WERK, R. How does *Toxoplasma gondii* enter hostcells? Reviews of infectious diseases, n.7, p.449–452, 1985.

WITTNER, M. Historic Perspective on the Microsporidia: Expanding Horizons. In: *The Microsporidia and Microsporidiosis*. WITTNER, M. Washington, D.C. **American Society for Microbiology**, p. 1-6. 1999.

WEBER, R., B.; et al.. Detection of *Septata intestinalis* in stool specimens and coprodiagnostic monitoring of successful treatment with albendazole.**Clinical Infect Disease**, v.19, p.342–345. 1994.

WEISS, L.M. Microsporidia: emerging pathogenic protists. **ActaTropica**, v. 78, p. 89–102. 2001.

WORK, T. M.; et al.. A new species of *Henneguya* (Myxozoa) in the big-eyed scad (*Selar crumenophthalmus*) from Hawaii.**Journal of Parasitology**., v.94, n.2, p. 524-529. 2008.

