

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



200333907

**MYXOZOA EM *Astyanax altiparanae* E *Serrasalmus spilopleura* (PISCES:
CHARACIDAE) ORIUNDOS DE AMBIENTE NATURAL**

Autora: Bianca Barassa

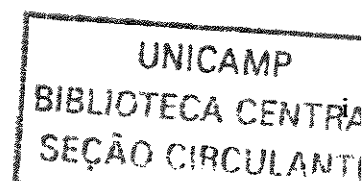
Orientador: Prof. Dr. Nelson da Silva Cordeiro

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Bianca Barassa
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção
do título de Mestre em Parasitologia

Campinas – SP

2003



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	Unicamp
	B231m
V	EX
TOMBO BC/	56398
PROC.	16-12403
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00189474-7

BIBID 305019

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

B231m

Barassa, Bianca

Myxozoa em *Astyanax altiparanae* e *Serrasalmus spilopleura* (Pisces: Characidae) oriundos de ambiente natural / Bianca Barassa .--
Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Nelson da Silva Cordeiro

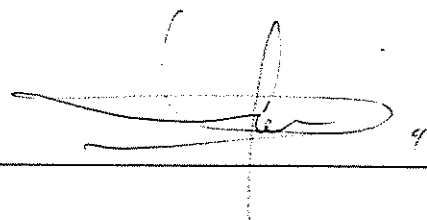
Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1. Peixes. 2. Histologia. 3. Taxonomia. I. Cordeiro, Nelson da Silva. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 30 de junho de 2003.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Nelson da Silva Cordeiro



Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta



Prof. Dr. Paulo Sérgio Cecarelli



Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco

“Aos meus pais Dirce e Luiz, pelo apoio e incentivo durante essa trajetória.”

“Ao meu noivo Rogério, pelo seu amor, amizade e compreensão.”

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Nelson da Silva Cordeiro pela orientação, confiança e apoio durante a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Sarah Arana, do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas pelo importante apoio na análise histotológica e pela análise crítica dos trabalhos provenientes da tese.

Às Professoras Doutoras Regina Maura Bueno Franco e Rosângela Junqueira Rocha, pela consideração, amizade e incentivo.

A todos os professores do Departamento de Parasitologia, em especial a professora Doutora Marlene Tiduko Ueta, pela amizade, sugestões e críticas a este trabalho.

Às Professoras Silmara Marques Allegretti, Regina Maura Bueno Franco e ao professor Doutor Paulo Sérgio Ceccarelli, pela contribuição da análise crítica do trabalho, possibilitando o aprimoramento do mesmo.

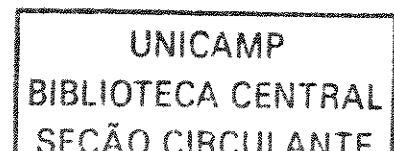
Ao Professor Mestre Gerson Augusto Ribeiro Silveira, Coordenador do Curso de Ciências Biológicas da Universidade São Francisco, pelo apoio, amizade e incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia pela assistência e amizade.

Aos colegas Nádia e Edson, pela amizade e constante colaboração, possibilitando o compartilhamento de idéias.

A todos os colegas do curso de pós-graduação, pela amizade e apoio durante esta trajetória.

À amiga Lucimara Teixeira, pela amizade, incentivo e colaboração desde a graduação.



ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. COMENTÁRIOS SOBRE MYXOZOA.....	6
3. OBJETIVOS.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1. Local de Coleta.....	12
4.2. Coleta dos Peixes.....	14
4.3. Exame Macroscópico.....	14
4.4. Exame Microscópico.....	15
4.5. Estudo Histopatológico.....	15
4.6. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	16
4.7. Determinação do Parasito.....	16
4.7.1. Hospedeiros.....	17
4.7.2. Estágio vegetativo.....	17
4.7.3. Esporos.....	17
4.8. Análise da Água.....	18
4.9. Análise dos Dados.....	18
5. RESULTADOS.....	19

Capítulo 1

A new species of *Henneguya* a gill parasite of *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae), from Brazil, with comments on histopathology and seasonality.

Abstract.....	20
Introduction.....	21
Materials and Methods.....	22
Results.....	23
Discussion.....	28
References.....	31

Capítulo 2

Henneguya sp. 1 (Myxosporea: Myxobolidae) infectando as nadadeiras de *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae), peixe da América do Sul

Resumo.....	34
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	36
Resultados.....	37
Discussão.....	42
Referências.....	44

Capítulo 3

Henneguya curvata sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae) parasiting the gills of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae: Serrasalminae), a South American freshwater fish.

Abstract.....	46
Introduction.....	47
Materials and Methods.....	47
Results.....	48

Discussion.....	52
References.....	54
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
8. ANEXO.....	63

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRA
SEÇÃO CIRCULANTI

RESUMO

Com a finalidade de contribuir com o conhecimento de parasitos do filo Myxozoa em peixes de água doce, acrescentando possíveis novas espécies às já descritas, foram examinados de Janeiro a Dezembro de 2001, 120 exemplares de *Astyanax altiparanae* e 18 exemplares de *Serrasalmus spilopleura*, coletados em um lago da Fazenda Rio das Pedras, localizada no município de Campinas, SP. Verificou-se também a prevalência e os aspectos histopatológicos provocados no hospedeiro.

Os peixes coletados com o auxílio de vara comum de pesca, foram transportados vivos para o laboratório, onde todos os seus órgãos foram examinados. A determinação do parasito foi realizada mediante comparações morfométricas com as espécies já descritas na literatura.

Em *A. altiparanae* foi observado a ocorrência de duas novas espécies de mixosporídios pertencentes ao gênero *Henneguya*: *Henneguya chydadea*, parasitando as brânquias, com prevalência de 88,3% e *Henneguya* sp. 1 parasitando as nadadeiras, com prevalência de 44,3%. O desenvolvimento dos cistos de *H. chydadea* no epitélio lamelar resultou em deformação da lamela e compressão dos capilares. Em estágios mais avançados observou-se retração das lamelas vizinhas, com redução da superfície para as trocas gasosas. Similar estudo histológico revelou que os cistos de *Henneguya* sp. 1, desenvolvem-se no tecido conjuntivo da base dos raios das nadadeiras. A presença desses cistos não provocou nenhuma resposta inflamatória no hospedeiro.

Nas brânquias de *S. spilopleura* foi verificado, a ocorrência de uma nova espécie de mixosporídio, *Henneguya curvata*, com prevalência de 100%. O parasito produziu deformação das estruturas lamelares, incluindo compressão dos capilares, o qual levou a um discreto edema. Em estágios mais avançados os cistos produziram fusão entre as lamelas vizinhas.

ABSTRACT

Aiming to contribute to the knowledge of parasites of the filo Myxozoa in freshwater fish, adding possible new species to the ones already described, 120 samples of *Astyanas altiparanae* and 18 samples of *Serrasalmus spilopleura* were examined between January and December 2001, collected from a lake located on Rio das Pedras farm, close to the city of Campinas, state of São Paulo, Brazil. Prevalence was also verified and the histopathological aspects provoked in the host.

The fish collected with the aid of an ordinary fishing rod, were transported alive to the laboratory, where all their organs were examined. The determination of the parasite was perceived upon morphometrical comparisons with the species already described in the literature.

In *A. altiparanae* was observed the occurrence of two new species of myxosporeans belonging to the genera *Henneguya*: *Henneguya chydadea*, parasitising the gill, with prevalence of 88.3 % and *Henneguya* sp. 1 parasitising the fins, with prevalence of 44.3 %. The development of the cysts of *H. chydadea* in the lamellar epithelium resulted in deformation of the lamellae and compression of the capillaries. In more advanced stages, retraction of the neighboring lamellae was observed, with reduction of the surface for the gas exchanges. Similar histological study revealed that the cysts of *Henneguya* sp. 1 developed in the conjunctive tissue of the basis of the radii of the fins. The presence of these cysts did not provoke any inflammatory response in the host.

In the gill of *S. spilopleura* was observed the occurrence of a new species of myxosporeans, *Henneguya curvata*, with prevalence of 100%. The parasite produced deformation of the lamellar structures, including compression of the capillaries, which lead to slight edema. In more advanced stages the cysts produced fusion among the neighboring lamellae.

1. INTRODUÇÃO

A ictiofauna da região neotropical é a mais diversificada, quando comparada com outras regiões do mundo. Estima-se que existam cerca de aproximadamente 8.000 espécies de peixes de água doce, ocorrendo em menos de 0,003% de água doce disponível no mundo. Esta estimativa representa 24% de toda a fauna de peixes do mundo e 1/8 de toda a biodiversidade de vertebrados (Schaefer, 1998).

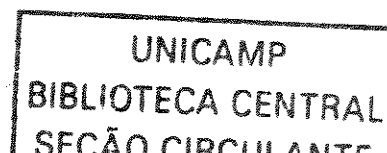
Böhlke et al.(1978), na década de 70, já calculavam que existiam 2.500 a 3.000 espécies de peixes descritas na América do Sul, podendo esta estimativa chegar a 5.000 espécies, sem levar em consideração o número de espécies de peixes descritas da América Central.

O Brasil é um dos países que apresenta o maior potencial do mundo para a produção de peixes, tendo em vista a vastidão de seu território, com mais de 2/3 ocupando a região tropical, privilegiadas e ricas bacias hidrográficas, onde se destaca a Bacia Amazônica responsável por aproximadamente 20% da água doce do mundo. Além disso, devemos ressaltar os 5 milhões de hectares de água represadas em açudes (Nordeste) e reservatórios, construídos para a geração de energia hidroelétrica ou para o abastecimento urbano e, aproximadamente 8 milhões de quilômetros de costa que possibilita uma enorme e variada atividade de aquicultura de espécies marinhas.

A ordem Characiformes apresenta aproximadamente 1.343 espécies de peixes descritas, sendo um dos maiores grupos de peixes de água doce do mundo (Nelson, 1994). Este agrupamento de organismos possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrados representantes vivendo na África do Sul e Central e América do Norte e Sul. Contudo a maior diversidade é verificada na região Neotropical (Buckup, 1998). A ordem Characiformes inclui a família Characidae, com aproximadamente 166 gêneros e 685 espécies de peixes descritas

(Nelson, 1984), sendo a subfamília Tetragonopterinae a que apresenta o maior número de espécies (Nomura, 1975). Dentre os gêneros desta subfamília, *Astyanax* é o gênero mais comum (Esteves, 1996), apresentando cerca de uma centena de espécies e subespécies, amplamente distribuídas por toda a América do Sul e Central (Garutti & Britski, 1997). As espécies do gênero *Astyanax* são relativamente pequenas (10 – 12cm de comprimento) e popularmente conhecidas por “lambari” no Brasil. Em geral, apresentam um grande potencial adaptativo e são denominadas euritópicas ou ainda de espécies com elevada valência ecológica (Garutti & Figueiredo-Garutti, 1992). Os “lambaris” desempenham um papel fundamental na cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos, servindo de alimento para vários peixes carnívoros de níveis tróficos superiores (Esteves, 1996) e, além disso, são muito apreciados na pesca esportiva (Barbieri et al., 1982; Barbieri & Barbieri, 1988; Barbieri & Marins, 1995). Apesar de seu pequeno porte, a sua carne saborosa, os tomam potencialmente úteis à piscicultura intensiva (Andrade et al., 1985).

Astyanax altiparanae Garutti & Britski, 2000, também conhecido por “tambiu” ou “lambari do-rabo-amarelo”, apresenta distribuição ampla no alto do rio Paraná, tendo sido identificado incorretamente por muito tempo (Garutti & Britski, 2000) com o nome de *Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758. Segundo Garutti & Britski (2000) o nome *A. bimaculatus* tem sido atribuído a um grupo de espécies do gênero *Astyanax* que apresentam uma mancha umeral negra horizontalmente ovalada, duas barras verticais marrons situadas na região umeral e uma mancha negra no pedúnculo caudal estendida até a extremidade dos raios medianos. Entretanto, segundo os mesmos autores, o nome *A. bimaculatus* deve ser atribuído apenas aos exemplares do Suriname.



Na bacia hidrográfica do alto do Paraná, *A. altiparanae* é a única espécie do gênero a apresentar os caracteres descritos para o grupo *bimaculatus*. Estes peixes são onívoros, alimentando-se predominantemente de larvas de insetos aquáticos (Esteves, 1996) e apresentam um período reprodutivo longo e anual, compreendido entre os meses de agosto e novembro, sendo a desova do tipo parcelada (Barbieri & Marins, 1995).

Dos peixes teleósteos da família Characidae, reconhecidamente predadores, as piranhas, pertencentes ao gênero *Serrasalmus* Lacépède, 1803, estão entre os principais e mais vorazes (Braga, 1975). Apresentam ampla distribuição na América do Sul, tendo como habitat rios, açudes, lagos e lagoas. Segundo Oliveira & Nogueira (2000), *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1860, é uma das espécies de piranha mais utilizadas para consumo na região do pantanal mato-grossense. O consumo destes peixes pela população local varia de três a quatro vezes por dia, sendo um dos únicos meios de obtenção de proteína animal pela população carente e população tradicional (indígena). Estes peixes medem aproximadamente 12-18cm de comprimento e geralmente são encontrados em pequenos grupos de vinte indivíduos. Apresentam uma atividade de forrageamento principalmente durante o dia, sendo encontrados no período noturno entre as vegetações (Sazima & Machado, 1990). Alimentam-se predominantemente de outros peixes, entretanto predam também alguns invertebrados e ocasionalmente vegetais (Braga, 1975).

A ictiofauna constitui-se num recurso alimentar importante sendo uma fonte primária de proteínas para humanos, acessível por exploração direta das populações naturais. Embora essas populações de peixes pareçam inesgotáveis, a ação predatória e a poluição ambiental têm contribuído para a sua redução.

Entre os principais fatores causadores de morte e patogenia em peixes destacam-se a poluição ambiental, a putrefação da matéria orgânica e a invasão dos peixes por agentes

patogênicos, sendo isto facilitado pelo ambiente aquático, tornando estes animais os organismos vertebrados mais parasitados. Em ambiente natural, as indicações patogênicas em peixes capturados são menos evidentes, quando comparadas com peixes que vivem em sistema de cultivo, pois raramente um organismo debilitado sobrevive, devido a seleção natural (Thatcher, 1981).

Com o crescimento da aquicultura, observado principalmente a partir da década de 90 em diversas regiões do mundo, o estudo das patologias de peixes torna-se cada vez mais importante (Kent et al., 2001). Entre as parasitoses de peixes que causam patologias temporárias, ou dependendo do sítio de infecção, responsáveis por danos aos seus hospedeiros, podendo levá-los à morte, devemos ressaltar aquelas causadas por mixosporídios. Este grupo de organismos parasitos, pertencentes ao filo Myxozoa Grassé, 1960, apresenta grande importância por infectarem peixes economicamente importantes.

O estudo de mixosporídios em peixes da família Characidae vem sendo realizado por vários pesquisadores (Azevedo et al., 1997; Casal et al., 1997; Martins & Souza, 1997; Molnár et al., 1998; Casal et al., 2002) . A maioria dos estudos, entretanto, apresenta apenas caráter taxonômico, fornecendo poucas informações a respeito da patogenia provocada por estes parasitos em seus hospedeiros.

Na literatura existem até o momento 11 espécies descritas de mixosporídios ocorrendo em “lambaris” sendo que nenhuma em *Astyanax altiparanae*, enquanto que em piranha há apenas 7 espécies descritas, três ocorrendo em *Serrasalmus spilopleura*.

Das espécies de mixosporídios descritas em “lambaris”, apenas 1 pertence ao gênero *Myxidium* Bütschli, 1882: *Myxidium cholecysticum* Cordeiro & Gioia, 1990 parasito da vesícula biliar de *A. scabripinnis* e 10 ao gênero *Henneguya* Thélohan, 1892: *Henneguya wenyoni* Pinto,

1928 parasito das brânquias de *Tetragonopterus* sp; *Henneguya cesarpintoi* Guimarães, 1931 parasito da cavidade branquial de *Astyanax fasciatus*; *Henneguya bergamini* Guimarães, 1931 parasito da cavidade do corpo de *A. fasciatus*; *Henneguya travassoni* Guimarães & Bergamini, 1933 parasito dos músculos de *A. fasciatus*; *Henneguya santae* Guimarães & Bergamini, 1934 parasito das brânquias de *Tetragonopterus santae*; *Henneguya pisciforme* Cordeiro et al. 1983 parasito das brânquias de *Hyphessobrycon anisitsi*; *Henneguya intracornea* Gioia et al. 1986 parasito do olho de *Astyanax scabripinnis*; *Henneguya hoimba* Cordeiro & Gioia, 1987 parasito das brânquias de *A. fasciatus*; *Henneguya artigasi* Gioia & Cordeiro, 1987 parasito das brânquias de *A. scabripinnis*, *Henneguya astyanax* Vital et al., 2003 parasito das brânquias de *Astyanax keithi*

Em piranha, das 7 espécies descritas de mixosporídios, 3 pertencem ao gênero *Henneguya*: *Henneguya ihering* Pinto, 1928 parasito das brânquias de *Serrasalmus spilopleura*, *Henneguya striolata* Casal et al., 1997 parasito das brânquias de *Serrasalmus striolatus* e *Henneguya pilosa* Azevedo & Matos, 2003 parasito dos filamentos branquiais de *Serrasalmus altuvei* e 4 ao gênero *Myxobolus* Bütschli, 1882: *Myxobolus pygocentris* Penido, 1927 parasito do conteúdo intestinal de *Pygocentris piraya*; *Myxobolus noguchii* Pinto, 1928 parasito das brânquias de *Serrasalmus spilopleura*; *Myxobolus serrasalmi* Walliker, 1969 parasito do baço, rim fígado de *Serrasalmus rhombeus* e *Myxobolus* sp. Walliker, 1969 parasito dos rins de *Serrasalmus* sp.;

2. COMENTÁRIOS SOBRE MYXOZOA

Os Myxosporea, são organismos parasitos obrigatórios de peixes, raramente são encontrados infectando répteis, anfíbios e platelmintos (Lom & Dyková, 1995). Existem aproximadamente 1350 espécies descritas, distribuídas em 52 gêneros, sendo a maioria encontrada parasitando peixes de água doce (Kent et al., 2001). Organismos pertencentes ao gênero *Myxobolus* são os mais comuns, com 450 espécies conhecidas (Salim & Desser, 2000). O gênero *Henneguya* apresenta 146 espécies (Eiras, 2002), sendo o mais comumente encontrado na América do Sul, com 32 parasitos descritos nesta região.

Os mixosporídios até a década de 90 foram agrupados ao Reino Protozoa, sendo o filo Myxozoa composto por duas classes. Os parasitos de peixes e raramente de platelmintos, répteis e anfíbios foram incluídos na classe Myxosporea, enquanto que a classe Actinosporea acomodava os parasitos de anelídios. Desde 1899, os mixosporídios eram considerados por alguns autores como metazoários, entretanto os estudos realizados naquela época não tiveram grande repercussão ou simplesmente foram ignorados (Kent et al., 2001). Segundo o estudo realizado por Kent et al. (2001), o filo Myxozoa apresenta apenas a classe Myxosporea, sendo os organismos pertencentes à classe Actinosporea um estágio de desenvolvimento. A presença de esporos multicelulares e resultados moleculares, segundo estes autores, indicam que os mixosporídios são metazoários.

A classe Myxosporea, até o momento, é dividida em duas ordens, a Bivalvulida Schulman, 1959 (esporos com duas valvas e uma a quatro cápsulas polares) e a Multivalvulida Schulman, 1959 (esporos com três a sete valvas e duas a sete cápsulas polares) (Lom & Dyková, 1995). Canning et al. (2000) propuseram uma terceira classe Malacosporea e a ordem

Malacovalvulida para acomodar as espécies de mixosporídios pertencentes ao gênero *Tetracapsula*, parasitos que infectam briozoários.

A localização dos mixosporídios nos hospedeiros é bastante variada, sendo encontrados em todos os tecidos e órgãos. Podendo ser histozóicos (encontrados intracelularmente, intercelularmente ou no lúmen dos vasos sanguíneos), ou ainda celozóicos (encontrados nas cavidades dos órgãos, principalmente vesícula biliar e bexiga natatória) (Lom, 1987).

Segundo Salim & Desser (2000) as espécies de mixosporídios apresentam um alto grau de especificidade, tanto para o hospedeiro como para os tecidos infectados. Entretanto na identificação de novas espécies, esse critério deve ter um papel secundário na taxonomia desses parasitos.

Apesar do grande número de espécies descritas de mixosporídios, poucas são conhecidas por causarem infecções sérias ou fatais em seus hospedeiros. Existem aproximadamente 15 gêneros que incluem espécies patogênicas (Lom & Dyková, 1995).

Entre as patologias de maior importância, provocadas por mixosporídios, podemos ressaltar aquelas causadas por *Myxobolus cerebralis* Hofer, 1903, que provoca a “Doença do Rodopio” em salmonídeos. O parasito destrói a cartilagem da cabeça e da coluna vertebral de peixes, promovendo elevadas taxas de mortalidade, principalmente em indivíduos jovens. *Myxidium truttae* Léger, 1930 responsável por infecções nos ductos biliares de salmonídeos em toda a Eurásia. *Ceratomyxa shasta* Noble, 1950 parasito de salmonídeos, é considerado economicamente importante, pois causa elevada perda de indivíduos jovens criados em sistema de cultivo e em ambiente natural (Eiras, 1994). *Shaerospora molnari* Lom, Dyková, Pavlasková & Grupcheva, 1983 infecta as brânquias de carpa. *Myxobolus muelleri* Butschli, 1882 parasito das brânquias de várias espécies de peixes, especialmente de ciprinídeos, causando elevada taxa

de mortalidade. Várias espécies do gênero *Kudoa*, *Unicapsula* e *Hexacapsula* tem sido encontradas causando lesões sérias na musculatura de peixes, comprometendo desta forma a aceitação do pescado pelo consumidor (Lom & Dyková, 1995). Espécies pertencentes ao gênero *Henneguya* vêm sendo descritas como importantes agentes patogênicos de peixes de água doce. Estes organismos têm sido encontrados produzindo severa reação inflamatória, hemorragia, hiperplasia e reação granulomatosa em seus hospedeiros (Dyková & Lom, 1978; Kalavati & Narasimhamurti 1985; Ferraz de Lima et al. 1995; Lom & Dyková 1995; Martins & Souza 1997; Martins et al. 1999b).

A patogenicidade causada por estes organismos não consiste apenas em seu caráter letal, mas também nos danos causados em alguns tecidos, portanto devemos considerar a importância desses parasitos, pois o seu principal hospedeiro são os peixes, e estes apresentam grande valor comercial para o homem.

Existem consideráveis informações sobre Myxosporea de peixes nos EUA, Europa e Ásia (Casal et al., 1996), entretanto pouco se conhece sobre a fauna desses organismos na América do Sul, particularmente da Bacia Amazônica, onde ocorre a maior diversidade de peixes (Azevedo & Matos, 2002).

A presença de mixosporídios em peixes da região Neotropical, vem sendo desde 1910 assinalada por vários pesquisadores. Desde então, diversas espécies de mixosporídios foram descritas parasitando peixes de diversas áreas geográficas. Em 1996 Gióia & Cordeiro publicaram uma lista com 52 espécies distribuídas em 11 gêneros de mixosporídios parasitando peixes no Brasil. As espécies do gênero *Henneguya* e *Myxobolus* foram as mais frequentemente encontradas, sendo 21 do gênero *Henneguya* e 13 do gênero *Myxobolus*. Os órgãos mais infectados por estes parasitos, segundo os autores, foram brânquias, vesícula biliar, rim e fígado.

Azevedo & Matos (1995, 1996) utilizaram características ultraestruturais na descrição de duas novas espécies de mixosporídios. *Henneguya adherens*, parasitando as brânquias de *Acestrorhynchus falcatus* e *Henneguya malabarica* infectando as brânquias de *Hoplias malabaricus*, peixes de água doce da Bacia Amazônica. A ultraestrutura dos esporos de *H. adherens* e *H. malabarica* revelou a presença de uma bainha, composta por uma substância hialina, circundando os esporos. Casal et al. (1996, 1997) descreveram *Myxobolus brasiliensis*, parasitando as brânquias de *Bunocephalus coracoideus* e *Henneguya striolata*, parasitando as brânquias de *Serrasalmus spilopleura*, peixes também provenientes da Bacia Amazônica. O estudo ultraestrutural revelou que os cistos de *M. brasiliensis*, apresentam uma parede de contorno sinuoso, com projeções na forma de vilosidades. Em *H. striolata* verificou-se a presença de microfilamentos ocupando completamente o espaço da célula perícita. Martins & Souza (1997) descreveram *Henneguya piaractus*, parasitando os filamentos brânquiais de *Piaractus mesopotamicus*, criados em sistema de cultivo no Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil. Azevedo et al. (1997) utilizando dados ultraestruturais descreveram *Henneguya testicularis*, infectando os testículos de *Moenkhausia oligolepis* da Bacia Amazônica. Os autores observaram a presença de uma bainha circundando os esporos, característica já descrita para outras espécies. Molnár et al. (1998) descreveram *Myxobolus macroplasmoidalis*, parasitando a cavidade abdominal de *Salminus maxillosus*, um peixe de água doce do rio Mogi-Guaçu, próximo a Cachoeira das Emas no município de Pirassununga. Martins et al. (1999a) descreveram *Henneguya leporinocola* infectando as brânquias de *Leporinus macrocephalus*, criados em sistema de cultivo. A análise histológica das brânquias de *Leporinus macrocephalus*, revelou que o parasito provoca intensa reação inflamatória e hemorragia. Ainda neste estudo foi observada diminuição da área respiratória e hiperplasia. Cellere et al. (2002) descreveram *Myxobolus*

absonus parasitando a cavidade opercular de *Pimelodus maculatus*, um peixe de água doce coletado do rio Piracicaba. Adriano et al. (2002) descreveram *Myxobolus porofilus* parasitando a cavidade visceral de *Prochilodus lineatus*, criados em sistema de cultivo no Centro Nacional de Pesquisa de Peixes Tropicais (CEPTA) em Pirassununga, SP, Brasil. O estudo histopatológico revelou a formação de uma fina camada de tecido conjuntivo ao redor dos cistos. Azevedo & Matos (2002) descreveram *Henneguya curimata*, parasitando os rins de *Curimata inornata*, um peixe coletado do rio Amazonas, perto de Belém (Pará). Casal et al. (2002) descreveram *Myxobolus maculatus*, parasitando os rins de *Metynnis maculatus*, peixe coletado também da bacia Amazônica. O parasito produziu danos ao tecido renal, como degeneração e vacuolização das células espiteliais. Azevedo et al. (2002) descreveram *Myxobolus desaequalis*, parasitando as brânquias de *Apteronotus albifrons*, peixe de água doce coletado do rio Amazonas, perto da cidade de Salvaterra. Casal et al. (2003) descreveram *Henneguya frideria*, infectando os filamentos branquiais, intestino, rim e fígado de *Leporinus frideria*, peixe de água doce coletado na região Amazônica, perto de Belém (Pará). Azevedo & Matos (2003) descreveram *Henneguya pilosa* parasitando os filamentos branquiais de *Serrasalmus altuvei*, coletados no Jardim Zoológico da cidade de Teresina (Piauí). A ultraestrutura dos esporos *H. pilosa* revelou a presença de uma massa granulo-fibrilar recobrando toda a superfície do esporo. Vital et al. (2003) descreveram *Henneguya astyanax* infectando as brânquias de *Astyanax keithi*, coletados na região Amazônica, perto de Belém (Pará). Barassa et al. (no prelo) descreveram *Henneguya curvata*, um parasito das brânquias de *Serrasalmus spilopleura*, coletados do lago da fazenda Rio das Pedras, Campinas (São Paulo), cujos cistos produziram deformação das estruturas lamelares e compressão dos capilares, com desenvolvimento de edema em alguns casos.

3. OBJETIVOS

- 1- Contribuir com o conhecimento da fauna de parasitos do filo Myxozoa em *Astyanax altiparanae* e *Serrasalmus spilopleura*.
- 2- Determinar a prevalência da infecção nos organismos infectados.
- 3- Verificar a variação sazonal desses organismos durante o período de um ano.
- 4- Verificar os efeitos do parasitismo sobre os tecidos e órgãos infectados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Local da Coleta

O trabalho de campo foi realizado em um dos lagos localizado na Fazenda Rio das Pedras (Figs. 1 e 2), no município de Campinas, região Sudeste do Estado de São Paulo (22° 31' 08,5"S, 22° 48' 27,3" W). A fazenda possui dois lagos formados pelo represamento de um pequeno riacho, que nasce na própria fazenda. O lago de maior extensão comunica-se com o lago de menor extensão, sendo que este deságua no Ribeirão das Pedras, que é contribuinte do Ribeirão Anhumas, que por sua vez deságua no Rio Atibaia. *Astyanax altiparanae* e *Serrasalmus spilopleura* coabitam com outras espécies de peixes no lago, entretanto durante o período de coleta não foram introduzidas artificialmente novas espécies.

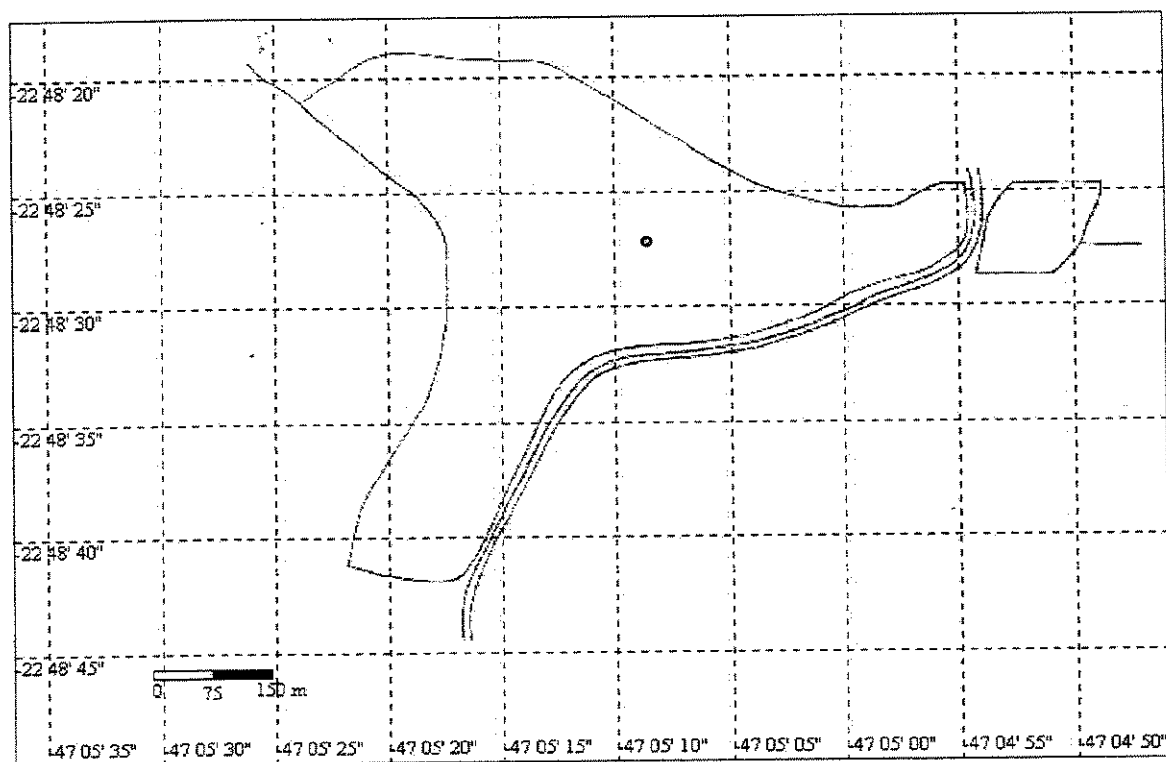


Figura 1: Mapa do Lago da Fazenda Rio das Pedras, situando as coordenadas do ponto de coleta.



Figura 2: Lago da Fazenda Rio das Pedras – Local de coleta dos peixes

4.2. Coleta dos Peixes

Durante um período compreendido de Janeiro a Dezembro de 2001, dez exemplares de *Astyanax altiparanae* foram coletados mensalmente, sendo as espécimes de *Serrasalmus spilopleura* coletadas de Janeiro a Junho do mesmo ano. As coletas sempre diurnas, foram realizadas com o auxílio de vara comum de pesca, utilizando-se como isca larva do coleóptero *Tenebrio* sp. Para facilitar a aproximação e a captura dos peixes foi realizada ceva com ração granulada de peixe. Todos peixes capturados foram recolhidos e transportados vivos ao laboratório, onde foram mantidos em aquários de 1.000L de capacidade, com água declorada e sob aeração constante, até que tivessem sido examinados todos os exemplares de cada coleta. As análises foram realizadas no mesmo dia, e quando não possíveis foram realizadas no dia seguinte.

4.3. Exame Macroscópico

Os peixes depois de sacrificados pela transecção do cordão espinhal, foram medidos em seu comprimento total, pesados e os resultados anotados em fichas apropriadas (Anexo I).

Após a análise macroscópica externa dos peixes, foi realizado a necrópsia para fins parasitológicos e em seguida foi determinado o sexo do animal.

Exames cuidadosos dos órgãos internos foram realizados para a detecção de cistos, sendo estes determinados por pontos esbranquiçados no tecido.

4.4. Exame Microscópico

Depois de realizado o estudo macroscópico de todos os órgãos, raspados ou pequenos fragmentos de órgãos que apresentaram pontos esbranquiçados, característico de infecção parasitária, foram comprimidos entre lâmina e lamínula, com a finalidade de verificar a presença do parasito e estudar as formas de desenvolvimento.

Os cistos de mixosporídios quando presentes, foram retirados cuidadosamente do tecido, colocados sobre lâmina em uma gota de solução salina e com o auxílio de estilete, rompidos para observações das formas de desenvolvimento do parasito (Rajendran et al., 1998).

As preparações foram examinadas com o auxílio de microscópio óptico Zeiss (modelo Standar), inicialmente sob o aumento de 100x e posteriormente com os aumentos de 250x, 400x e 1000x.

4.5. Estudo Histopatológico

Para o estudo histopatológico, fragmentos de aproximadamente 1cm³ de tecidos dos órgãos parasitados, foram fixados em formalina 10% tamponada, por 24h para conservação. Posteriormente as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico, clarificadas pelo xilol e incluídas em parafina. Os cortes de aproximadamente 4µm de espessura foram posteriormente corados por hematoxilina-eosina e em seguida observados ao microscópio.

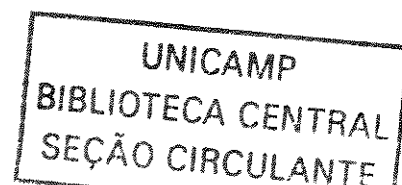
4.6. Microscopia Eletrônica de Varredura

Esporos livres foram depositados em laminula impregnada com poli-L-lisina, fixados em glutaraldeído, lavados em solução tampão de cacodilato de sódio a 1M, desidratados em soluções crescentes de álcool, secos com ponto crítico, cobertos com ouro e examinados ao microscópio JEOL JMS – 5900 Lv, operado com 15 Kv, do Laboratório de Microscopia Eletrônica/ Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas, São Paulo, Brasil.

4.7. Determinação do Parasito

Todas as observações foram realizadas a partir de preparações a fresco. Para confecção de material permanente, esfregaços contendo esporos livres foram secos à temperatura ambiente, fixados em álcool metílico, corados por solução de Giemsa (pH 7.2) e montados em CytosealTM. Os esporos foram também tratados em solução de Lugol para a visualização do vacúolo iodofílico no esporoplasma (Cordeiro et al., 83/84). Para verificar a presença de envelope mucoso nos esporos foi empregado o método de tinta da Índia (Nanquim), segundo Lom & Vávra, 1963.

A identificação das espécies de mixosporídios foi feita de acordo com os critérios propostos por Lom & Arthur em 1989, como demonstrado a seguir:



4.7.1. Hospedeiros

A identificação da espécie de hospedeiro, bem como o seu estágio de vida, sítio de infecção dos parasitos e respectivas prevalências, são fatores que devem ser relacionados para a identificação dos mixosporídios.

4.7.2. Estágio Vegetativo

Os estágios vegetativos do parasito, foram caracterizados quanto ao sítio de infecção, bem como se é histozóico (intracelular, intercelular ou no lúmen dos vasos sanguíneos) ou celozóico (cavidades dos órgãos). Ainda foram observados quanto a forma (oval, alongado ou irregular) e quanto ao tamanho e se houve ou não diferenciação em ecto ou endoplasma, presença de movimentos, formação de pseudópodos e quanto ao número de esporos produzidos.

4.7.3. Esporos

As características dos esporos são as mais importantes na identificação dos mixosporídios. Estes foram caracterizados quanto a sua forma e estrutura; estrutura e orientação da linha de sutura; forma das cápsulas polares (redonda, piriforme ou elipsóide); número e disposição de voltas dos filamentos polares; presença de projeções ou apêndices caudais; existência de estrias ou outras características na superfície do espora; relação de tamanho entre as cápsulas polares; tamanho da cápsula polar em relação ao espora; posição da extremidade anterior da cápsula polar; posição do esporoplasma na cavidade do espora; presença de muco envolvendo a superfície do espora; presença e forma do vacúolo iodofílico; tamanho dos esporos e variabilidade da forma e tamanho dos esporos.

As medidas dos esporos, todas em micrômetros, foram realizadas com o auxílio do microscópio óptico, equipado com ocular tracejada de aumento 10X e objetiva de imersão (100X), calibrado com uma lâmina micrométrica. A média seguida pelo desvio padrão, e o número das estruturas medidas estão apresentados entre parênteses.

Os desenhos foram executados em microscópio binocular de luz transmitida, em câmera clara, utilizando-se ocular de 10x e objetiva de imersão (100X).

4.8. Análise da Água

As variáveis químicas e físicas da água como temperatura, pH, condutividade elétrica, sólidos dissolvidos e oxigênio dissolvido, foram medidas mensalmente durante as coletas. Estes procedimentos foram realizados com o auxílio de equipamento de multianálise de água Corning Check Mate modelo 90.

4.9. Análise dos Dados

A análise da prevalência do parasitismo por mixosporídio nos peixes, foi realizada de acordo com Bush et al. (1997).

A existência da possível correlação entre a prevalência do parasitismo e os parâmetros físicos e químicos da água foi verificada usando-se o coeficiente de correlação de Pearson, utilizando-se o programa BioEstat 2 for Windows. O teste do Chi-square foi utilizado para comparar a prevalência do parasita durante as estações, utilizando-se o mesmo programa citado anteriormente.

5. RESULTADOS

Estruturamos a tese em três capítulos, onde cada um aborda a descrição de uma nova espécie de parasito pertencente ao filo Myxozoa, bem como a prevalência e as alterações histopatológicas provocadas no hospedeiro.

Capítulo 1

A new species of *Henneguya*, a gill parasite of *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae) from Brazil, with comments on histopathology and seasonality⁺

Bianca Barassa, Nelson S Cordeiro, Sarah Arana*

Departamento de Parasitologia e *Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas-Unicamp, Caixa Postal 6109, 13083-970
Campinas, SP, Brasil

Abstract. A new species of Myxosporea, *Henneguya chydadea*, is described parasitizing the gills of *Astyanax altiparanae* collected from a lake on Rio das Pedras farm near Campinas, State of São Paulo, Brazil. Of the fish examined, 88,3 % had gills parasitized by myxosporeans. The prevalence of the parasite ranged from 80% in the spring and fall, 93% in the summer and 100% in the winter. The parasite induced the formation of white, oval-shaped cysts measuring 50 µm x 70 µm which deformed the gill lamellae, compressed of the capillaries, and caused retraction of the neighboring lamellae. The mature spores were elongated and had two identical, parallel elongate polar capsules. Each capsule contained a polar filament with 9-10 turns. There was no mucous envelope or iodophilous vacuole. Morphometric differences between this parasite and other species of the genus *Henneguya* indicated, that the parasite observed in *A. altiparanae* was a new species. This is the first report of a myxosporean parasitizing *A. altiparanae*.

Key Words: *Astyanax* sp.; *Astyanax altiparanae*; Brazil; *Henneguya chydadea* sp. n.; Histopathology; Lambari; Myxosporea; South America.

⁺ Trabalho enviado para publicação nas Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Introduction

The fish fauna of the neotropical is the most diversified of the world, and represent about 24% of the global marine and freshwater fish species (Schaefer 1998). With the growth of aquiculture in several regions of the world since 1990 (Kent et al. 2001), the study of fish pathologies has become increasingly important. Among agents responsible for diseases in fish are the myxosporeans, which cause serious damage to economically important fish species. There are approximately 1.350 species of myxosporeans distributed in 52 genera, most of which parasitize freshwater fish (Kent et al. 2001).

Among myxosporeans, the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 is the most abundant in South America, with 32 known species. The importance of this genus as a pathogen of freshwater fish has been described by several authors (Dyková & Lom 1978, Kalavati & Narasimhamurti 1985, Lom & Dyková 1995, Martins & Souza 1997, Martins et al. 1999b). Among freshwater fish, the genus *Astyanax* Baird & Girard, 1854 contains approximately 100 species and subspecies that are widely distributed through out South and Central America (Garutti & Britski 1997). These small size fish, popularly known as “lambari” in Brazil, occupy a fundamental position in the food chain of aquatic ecosystems, were they serve as food for several predators (Esteves 1996). In addition to their commercial value as a source of food in several regions, “lambari” are also much appreciated for sport fishing (Barbieri & Marins 1995).

The presence of myxosporeans in “lambari” has been reported, with ten species of *Henneguya* having been described so far (Cordeiro et al. 1983/84, Gioia et al. 1986, Gioia & Cordeiro 1987), although none in *A. altiparanae*.

During a study of the myxosporean fauna in *A. altiparanae* Garutti & Britski, 2000 collected near the city of Campinas, in the State of São Paulo, Brazil, we observed a new species

of *Henneguya* parasitizing the gills of this species. In this paper, we describe this new species, and report the prevalence and histopathological modifications caused by this parasite.

Material and Methods

Ten juvenile and adult specimens of *A. altiparanae* were collected monthly from January to December, 2001 from a lake located on Rio das Pedras farm, close to the city of Campinas and examined for the presence of myxosporeans. The fish were transported alive to the laboratory where they were killed, by transection of the spinal cord, then measured and necropsied. Twenty spores from freshly prepared material obtained from different fish specimens were measured immediately (Lom & Arthur 1989) using a micrometer incorporated into a microscope. The dimensions were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). The spores were treated with Lugol solution to determine the presence of iodophilous vacuoles in the sporoplasma, and with India ink to detect the presence of a mucous envelope (Lom & Vávra 1963). Smears containing free spores were fixed in methanol, stained with Giemsa solution (pH 7.2) and mounted in Cytoseal™. For histopathological analysis, fragments of gill containing cysts obtained from the same specimens of *A. altiparanae*, were fixed in buffered 10% formalin for 24 h and included in paraffin. Sections 4 μ m thick were stained with hematoxylin–eosin. For scanning electron microscopy (SEM), free spores were placed on a slide coated with poly-L-lysine then fixed in glutaraldehyde, and washed with 1 M sodium cacodylate buffer before dehydration in an alcohol series. After critical point drying, the samples were coated with gold and examined with a JEOL JMS-5900LV electron microscope operated at 15 kV.

Results

Of the 120 (117 adult and 3 juvenile) specimens of *A. altiparanae* examined, 106 (88.3%) had gills parasitized by myxosporeans. Of the fish parasitized, 97.2% were adult and 2.8% were juveniles. The overall prevalence of the parasite in males and females was 77.8% and 90.2%, respectively. The prevalence of the parasites ranged from 80% in the spring and fall, 93% in the summer and 100% in the winter. The range between the prevalence was not significant ($\chi^2_3 = 1.01$; $p = 0.05$). In the spring, the prevalence of infected adult and juveniles was 79.3% (23/29) and 100% (1/1) respectively, whereas in the summer, the corresponding values were 92.8% (26/28) and 100% (2/2). In the fall and winter, the prevalence of infected adult was 80% (24/30) and 100% (30/30) respectively. No juveniles were collected in these two seasons. There was no significant correlation between the prevalence of parasites and the chemical and physical properties of the water, including pH ($r = 0.25$; $p = 0.42$), conductivity ($r = 0.39$; $p = 0.19$), dissolved oxygen ($r = -0.11$; $p = 0.73$), dissolved solids ($r = 0.29$; $p = 0.34$) and temperature ($r = -0.35$; $p = 0.26$). Based on the shape and dimensions of the spores, the myxosporean studied was identified as a new species of *Henneguya*.

Description

Henneguya chydadea sp. n.

Figs. 1-3

Vegetative stage. White and oval-shaped cysts measuring 50 μm x 70 μm were encountered in the gill lamellae of *A. altiparanae*. When opened, spores in all stages of development were observed (Fig. 3A).

Spores (n = 20). The mature spores are elongated (total length $18.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$; spore length $9.7 \pm 0.7 \mu\text{m}$; spore width $4.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$; length of tail appendix $9.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$). The sporeplasma has two nuclei in fresh preparations. The two polar capsules are elongated and of equal size (length $3.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$, width $1.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$). Each polar capsule has a polar filament with 9-10 turns, arranged perpendicular to the axis of the capsule. The wall of the spore is smooth and has two symmetrical valves with a visible line of suture (Figs. 1 and 2). Scanning electron microscopy revealed two pores for the discharge of polar filaments situated at the anterior extremity of the spore on one side of the line of suture (Fig. 2B). There was no mucous envelope or iodophilous vacuole.

Type host: *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Characidae: Tetragonopterinae)

Site of infection: Gill lamella epithelium

Prevalence: 88.3% (106/120)

Locality: Rio das Pedras farm, municipality of Campinas, São Paulo state, Brazil.

Type of material: Slides with stained spores of *H. chydadea* sp. n. (Syntipe) were deposited in the collection of the Museum of Natural History in the Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP) (accession numbers ZUEC 10 and 11).

Etymology: The specific name of the parasite is derived of the latin word *chydadeus* (= common)

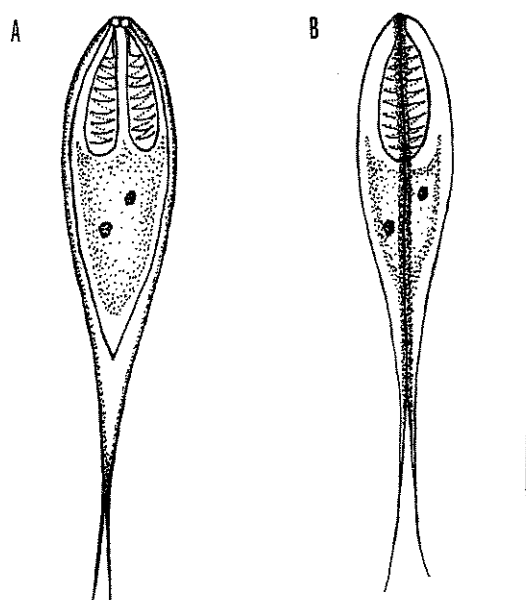


Fig. 1: Schematic representation of mature spores of *Henneguya chydadea* sp. n. A: frontal view; B: lateral view. Bar = 10µm.

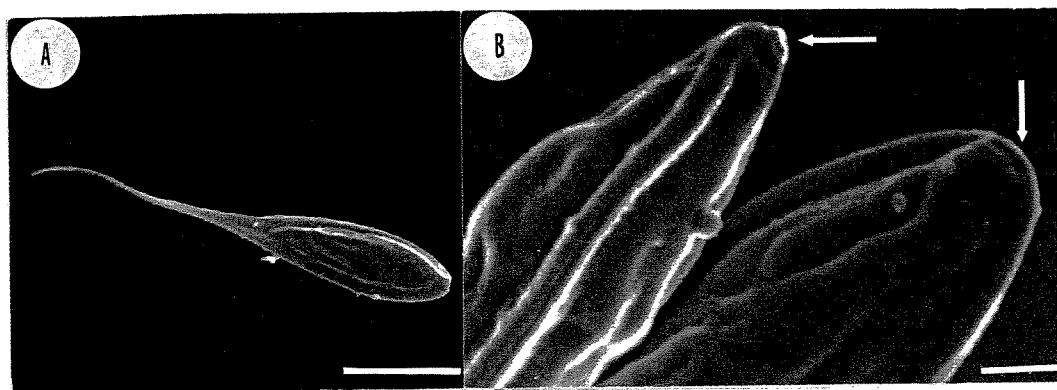


Fig. 2: Scanning electron micrograph of *Henneguya chydadea* sp. n. from *Astyanax altiparanae*.

A: frontal view. Bar = 5 μ m; B: lateral view: note the presence of two pores for discharge of polar filaments situated at the anterior extremity of the spore on side of the line of suture. Bar = 1 μ m.

Histology. Histological analysis of the gill of *A. altiparanae* revealed that the *H. chydadea* cysts were of the intralamellar-type located in the gill lamella epithelium. The initial development of the cysts occurred in several regions (basal, median and distal) of the gill lamella without compromising the gill structure (Figs. 3B-C). In more advanced stages, the cysts occupied all of the lamella, resulting in malformation, compression of the capillaries and withdrawal of the neighboring lamellae (Fig. 3D). Throughout the development of the cysts, no inflammatory reaction or hyperplasia was observed, although there was occasionally discrete edema.

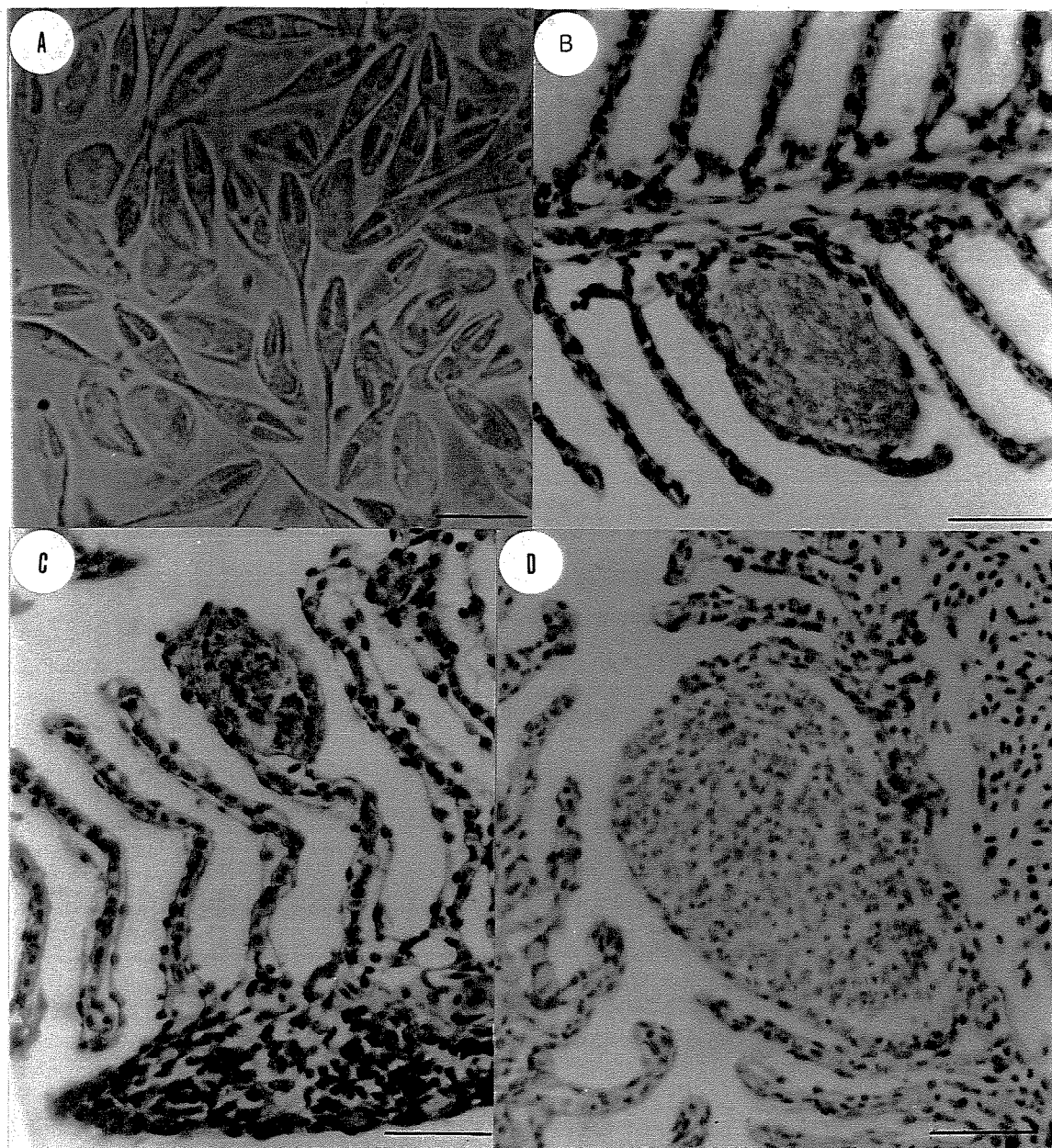


Fig 3: *Henneguya chydadea* sp. n. from *Astyanax altiparanae*. A: spores in a fresh preparation. Bar = 5 μ m. B-D: histological sections of the gill. B: immature cyst located in region basal and median of the gill lamella. Bar = 30 μ m; C: immature cyst situated in region distal of the gill lamella. Bar = 30 μ m; D: mature cyst occupying the entire length of the lamella. Bar = 30 μ m.

Discussion

The shape and dimensions of the cysts and spores of *H. chydadea* were compared with those of other species of *Henneguya* reported for freshwater fish of South America and other parts of the world. Of the species described, only *H. wenyoni* Pinto, 1928, which parasitizes the gills of *Tetragonopterus* sp., and *H. santae* Guimarães & Bergamini, 1934, which parasitizes the gills of *Tetragonopterus santae*, shared some features with *H. chydadea*. The spores of *H. wenyoni* resembled those of *H. chydadea* in body length and in the length and width of the polar capsules. However, the spores of *H. wenyoni* had a longer tail process and the body was wider. The morphology and body width of the spores of *H. santae* were similar to those of *H. chydadea*, but the tail process of *H. santae* was longer and the body and polar capsule lengths were shorter than in *H. chydadea*. In addition, the spores of *H. wenyoni* and *H. santae* had an iodophilous vacuole and the polar capsules were of variable size, whereas in *H. chydadea* the iodophilous vacuole was absent and the polar capsule dimensions were constant. The dimensions of the cysts in *H. wenyoni* (2 mm x 1 mm) and *H. santae* (1 mm x 0.70 mm) were greater than those of *H. chydadea* cysts (50 μ m x 70 μ m). Based on the morphometric differences, the parasite observed in *A. altiparanae* was considered to be a new species of *Henneguya*, and the first to be recorded in *A. altiparanae*.

The number of mature *H. chydadea* cysts and spores in the gills of *A. altiparanae* was greatest during the winter, and gradually decreased thereafter, probably through rupture. These observations suggest that *H. chydadea* has a seasonal cycle of development in *A. altiparanae*, although further studies are needed to confirm this. The properties of the lake water had no effect on the prevalence of the parasite throughout the year.

A seasonal reproductive cycle has also been reported for other species of *Henneguya*. Molnár (1998) observed seasonality and synchronicity in the development of the cysts and spores of *H. creplini*, a parasite of the gills of *Stizostendion lucioperca*. The young cysts of *H. creplini* appeared in the gills of *S. lucioperca* in April and gradually grew to form spores in the winter. Rupture of the cysts to release the spores occurred in March of the following year. Cone (1994) reported that for *H. doori*, a parasite of *Perca flavescens*, cyst development and spore release occurred between September of one year and March of the following year. This author also observed that rupture of the cysts and the release of spores occurred following an increase in temperature.

The development of *H. chydadea* cysts in the epithelium of the gill lamellae of *A. altiparanae* resulted in deformation of the lamellae and compression of the capillaries. In more advanced stages, when the cysts occupied the entire length of a lamella, retraction of the neighboring lamellae was observed, with a reduction in the surface available for gas exchange. In the initial stages, cysts development occurred on one side of the gill lamella, with marked dilatation of the side infected. According to Molnár (2002), such cysts are classified as asymmetric.

In a similar histopathological study of the gills of *S. lucioperca* parasitized by *H. creplini*, which produce the same kind of cysts, as those described here, Molnár (1998) also reported hyperplasia and the formation of a thick layer of granular tissue.

In other work, Kalavati & Narasimhamurti (1985), who studied *Channa punctatus* infected by *H. waltirensis*, Martins & Souza (1997), who studied the gills of *Piaractus mesopotamicus* parasitized by *Henneguya* sp., and Martins et al. (1999a), who studied the gills of

Leporinus macrocephalus infected by *Henneguya leporinocola*, observed hemorrhage and/or inflammatory foci, neither of which was seen here.

Although massive infection by *H. chydadea* was not observed, the histopathological alterations (deformation of the structures, compression of the capillaries and retraction of the neighboring lamellae) indicated that this parasite is potentially pathogenic, and that a high parasite load could compromise gill functions.

Acknowledgements

The authors thank the Laboratório de Microscopia Eletrônica at the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, SP, for use of the electron microscope, Nilson Branco (Department of Parasitology / UNICAMP) for her assistance in the field work and Dr. Stephen Hyslop for editing of the English.

References

- Barbieri G, Marins MA 1995. Estudo da dinâmica da reprodução de fêmeas de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) da Represa do Lobo, Estado de São Paulo (Osteichthyes, Characidae). *Arq Biol Tecnol* 38: 1191-1197.
- Cone DK 1994. Annual cycle of *Henneguya doori* (Myxosporea) parasiting yellow perch (*Perca flavescens*). *J Parasitol* 80: 900-904.
- Cordeiro NS, Artigas PT, Gióia I, Lima RS 1983/84. *Henneguya pisciforme* n. sp., myxosporídio parasito de brânquias do lambari *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Characidae). *Mem Inst Butantan* 47/48: 61-69.
- Dyková I, Lom J 1978. Histopathological changes in fish gills infected with myxosporidian parasites of the genus *Henneguya*. *J Fish Biol* 12:197-202.
- Esteves KE 1996. Feeding ecology of three *Astyanax* species (Characidae, Tetragonopterinae) from a floodplain lake of Mogi-Guaçu river, Paraná river basin, Brazil. *Environ Biol Fish* 46: 83-101.
- Garutti V, Britski HA 1997. Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Teleostei, Characidae), com mancha umeral horizontalmente ovalada, da Bacia do Rio Guaporé, Amazônia. *Papeis Avul Zool São Paulo* 40: 217-229.
- Gióia I, Cordeiro NS 1987. Myxosporea da ictiofauna brasileira: *Henneguya artigasi* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae). XIV Cong Bras Zoologia, Juiz de Fora, p. 186.
- Gióia I, Cordeiro NS, Artigas PT 1986. *Henneguya intracornea* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) parasito de olho de lambari, *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Osteichthyes, Characidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 401-407.

- Kalavati C, Narasimhamurti CC 1985. Histopathological changes in the gills of *Channa punctatus* BL infected with *Henneguya waltirensis*. *Arch Protistenk* 129: 199-202.
- Kent ML, Andree KB, Bartholomew JL, El-Matbouli M, Desser SS, Delvin RH, Feist SW, Hedrick RP, Hoffmann RW, Khattra J, Hallett SL, Lester RJG, Longshaw M, Palenzeula O, Siddall ME, Xiao CX 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J Euk Microbiol* 48: 395-413.
- Lom J, Arthur JR 1989. A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *J Fish Dis* 12: 151-156.
- Lom J, Dyková L 1995. Myxosporea (Phylum Myxozoa). In PTK Woo, *Fish Diseases and Disorders - Protozoan and Metazoan Infections*, Vol. 1, Cab International, p. 87-147.
- Lom J, Vávra J 1963. Mucous envelopes of spores of the subphylum Cnidospora (Doflein, 1901). *Vestn Cesk Spol Zool* 27: 4-6.
- Martins ML, Souza VN 1997. *Henneguya piaractus* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae), a gill parasite of *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae), in Brazil. *Rev Bras Biol* 57: 239-245.
- Martins ML, Souza VN, Moraes JRE, Moraes FR 1999a. Gill infection of *Leporinus macrocephalus* Garavello & Bristski, 1988 (Osteichthyes: Anostomidae) by *Henneguya leporinocola* n. sp (Myxozoa: Myxobolidae) description, histopathology and treatment. *Rev Bras Biol* 59: 527-534.
- Martins ML, Souza VN, Moraes JRE, Moraes FR, Costa AJ 1999b. Comparative evaluation of the susceptibility of cultivated fishes to the natural infection with myxosporean parasites and tissue changes in the host. *Rev Bras Biol* 59: 263-269.

- Molnár K 1998. Taxonomic problems, seasonality and histopathology of *Henneguya creplini* (Myxosporea) infection of the pikeperch *Stizostedion lucioperca* in Lake Balaton. *Folia Parasitol* 45: 261-269.
- Molnár K 2002. Site preference of fish myxosporeans in the gill. *Dis Aquat Org* 48: 197-207.
- Schaefer SA 1998. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidea: Loricariidae). In LR Malabarba, RE Reis, RP Vari, ZMS Lucena, CAS Lucena (eds) 1998. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 375-400.

Capítulo 2

***Henneguya* sp. 1 (Myxosporea: Myxobolidae) infectando as nadadeiras de *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae), peixe da América do Sul⁺**

Bianca Barassa, Nelson S Cordeiro & Sarah Arana^{*}

Departamento de Parasitologia e ^{*}Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, Caixa Postal 6109, 13083-970
Campinas, SP, Brasil

Resumo. Uma nova espécie de mixosporídio, *Henneguya* sp. 1, é descrita parasitando as nadadeiras de *Astyanax altiparanae* com prevalência de 44,2%. Os exemplares jovens e adultos foram coletados do lago da Fazenda Rio das Pedras, no município de Campinas, SP, Brasil. O parasito forma cistos brancos e de forma esférica, medindo aproximadamente 120µm de diâmetro. Os cistos não provocaram resposta inflamatória no hospedeiro. Os esporos maduros são alongados (comprimento total 34.0 ± 0.9 µm; comprimento do esporo 14.6 ± 0.6 µm; largura do esporo 6.0 ± 0.4 µm; comprimento do processo caudal 19.2 ± 1.0 µm). As cápsulas polares são de igual tamanho (comprimento 6.8 ± 0.4 µm; largura 6.0 ± 0.4 µm) e apresentam um filamento polar com 12 – 13 voltas, arranjado perpendicularmente ao eixo da cápsula. As valvas de parede lisa são simétricas e apresentam uma linha de sutura visível. A microscopia eletrônica de varredura revelou a presença de um sulco, na superfície das valvas do esporo. Não foi observado a presença de vacúolo iodofílico e de envelope mucoso ao redor dos esporos.

Palavras Chaves: *Astyanax*; *Astyanax altiparanae*; América do Sul; Brasil; *Henneguya*; Lambari; Myxosporea; Nadadeiras;

⁺ Trabalho apresentado de acordo com as normas das Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Introdução

A fauna de peixes constitui-se num recurso alimentar importante, sendo utilizada como fonte primária de proteínas para humanos em várias regiões do mundo. Peixes provenientes tanto de ambiente natural como de sistema de cultivo, de diversas áreas geográficas, são infectados por várias espécies de mixosporídios pertencentes ao gênero *Henneguya* (Gióia & Cordeiro, 1996; Casal et al., 1997; Martins & Souza, 1997; Kostoingue et al., 2001; Azevedo & Matos, 2002; Barassa et al., no prelo).

Aproximadamente 146 espécies pertencentes ao gênero *Henneguya* foram descritas (Eiras, 2002), sendo 32 parasitando peixes da América do Sul.

Apesar da maioria dos estudos, na América do Sul, basear-se apenas em dados morfométricos dos esporos, vários autores vem realizando estudos histológicos e ultraestruturais dos mixosporídios, bem como de aspectos histopatológicos (Casal et al., 1997; Azevedo et al., 1997; Martins et al., 1999; Adriano et al., 2002; Azevedo & Matos, 2002; Barassa et al., no prelo)

Neste trabalho é descrito uma nova espécie de mixosporídio parasitando as nadadeiras de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000, conhecido popularmente por “tambiu” ou “lambari do rabo amarelo”. Estes peixes apresentam distribuição ampla no alto do rio Paraná, sendo muito apreciado na pesca esportiva (Barbieri et al., 1982; Barbieri & Marins, 1995) e na piscicultura intensiva (Andrade et al., 1985).

Material e Métodos

Dez exemplares jovens e adultos de *Astyanax altiparanae* foram coletados mensalmente de um lago localizado na Fazenda Rio das Pedras, no município de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil, entre Janeiro a Dezembro de 2001. Depois de coletados, os peixes foram transportados vivos para o laboratório onde foram sacrificados, pela transecção do cordão espinal, medidos e necropsiados. As medidas dos esporos maduros foram feitas diretamente do material preparado a fresco (Lom & Arthur, 1989), com o auxílio de uma ocular micrométrica, e as dimensões expressas como médias $\pm$ D.P. Os esporos foram tratados com solução de Lugol, para verificar a presença de vacúolo iodofilico no esporoplasma, e com tinta da Índia para evidenciar a presença de envelope mucoso (Lom & Vávra, 1963). Preparações permanentes foram fixadas em metanol, coradas por solução de Giemsa (pH 7.2) e montadas em Cytoseal™. Para a análise histológica, fragmentos de nadadeiras, contendo cistos de mixosporídios, foram fixados em formalina 10% tamponada, descalcificados em EDTA 10%, incluídos em parafina, cortados a 4 μ m de espessura e corados por hematoxilina-eosina. Para a microscopia eletrônica de varredura, esporos livres foram depositados em uma lâminula impregnada com poli-L-lisina, fixados em glutaraldeído, lavados em solução tampão de cacodilato de sódio a 1M, desidratados em soluções crescentes de álcool, secos com ponto crítico, cobertos com ouro e examinados ao microscópio JEOL JMS – 5900LV operado com 15Kv do Laboratório de Microscopia Eletrônica / Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas, SP, Brasil.

Resultados

Dos 120 (117 adultos e 3 jovens) exemplares de *Astyanax altiparanae*, examinados durante o período de um ano, 53 (44,2%) apresentaram pelo menos uma das nadadeiras (dorsal, caudal e anal) parasitadas por uma espécie de mixosporídio do gênero *Henneguya*. Dos peixes parasitados 96,2% foram adultos e 3,8% foram jovens. A prevalência total do parasito nos machos e nas fêmeas foi 44,4% (8/18) e 44,1% (45/102) respectivamente. Durante as estações do ano a prevalência do parasito variou de 50% na primavera, 90% no verão, 3,3% no outono 33,3% no inverno, sendo esta diferença significativa ($\chi^2_3 = 26,6$; $p = 0,05$). Na primavera a prevalência de adultos e jovens infectados foi 51,7% (15/29) e 0% (0/1) respectivamente, enquanto que no verão as prevalências variaram de 89,3% (25/28) e 100% (2/2). No outono e no inverno a prevalência de adultos infectados foi de 3,33% (1/30) e 33,3% (10/30) respectivamente. Durante estas estações não foram coletados exemplares jovens.

A análise dos parâmetros químicos e da temperatura da água, revelou que não houve correlação com a prevalência do parasitismo (pH: $r = -0,44$, $p = 0,14$; condutividade: $r = 0,61$, $p = 0,03$; oxigênio dissolvido $r = 0,31$, $p = 0,31$; sólidos dissolvidos: $r = 0,3$, $p = 0,33$ e temperatura $r = 0,62$, $p = 0,03$).

A comparação das características morfométricas dos esporos, com as espécies do gênero *Henneguya* já conhecidas (Tabela I), sugerem que o material em estudo representa uma nova espécie de mixosporídio pertencente ao gênero *Henneguya*.

Descrição*Henneguya* sp. 1.

Figs 1-2

Estágio vegetativo. Cistos brancos e de forma esférica, medindo aproximadamente 120µm de diâmetro, foram encontrados desenvolvendo-se nas nadadeiras dorsal, anal e caudal de *A. altiparanae*. Os cistos quando rompidos continham apenas esporos maduros. (Fig. 2A)

Esporos (n = 20). Os esporos maduros são alongados (comprimento total 34.0 ± 0.9 µm; comprimento do esporo 14.6 ± 0.6 µm; largura do esporo 6.0 ± 0.4 µm; comprimento do processo caudal 19.2 ± 1.0 µm). As duas cápsulas polares de igual tamanho (comprimento 6.8 ± 0.4 µm; largura 6.0 ± 0.4 µm) apresentam um filamento polar com 12 – 13 voltas, arranjado perpendicularmente ao eixo da cápsula. As valvas de parede lisa são simétricas e apresentam uma linha de sutura visível (Figs. 1, 2C e 2D). A microscopia eletrônica de varredura revelou a presença de um sulco, na superfície das valvas do esporo (Fig. 2D). Não foi observada a presença de vacúolo iodofílico e de envelope mucoso ao redor dos esporos.

Hospedeiro tipo: *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Characidae: Tetragonopterinae)

Sítio de infecção: Tecido conjuntivo da base das nadadeiras dorsal, anal e caudal

Prevalência: 44,2% (53 / 120)

Localidade: Fazenda Rio das Pedras, Campinas, São Paulo, Brasil.

Material tipo: Lâminas coradas contendo esporos de *Henneguya* sp. 1 (Sintipo) serão depositadas no Museu de História Natural no Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas/ UNICAMP (N^{os}-)

Histologia. A análise histológica das nadadeiras de *A. altiparanae* revelou que os cistos de *Henneguya* sp. 1 desenvolvem-se no tecido conjuntivo da base dos raios das nadadeiras dorsal, anal e caudal (Fig. 2B). A presença desses cistos não produziu resposta inflamatória no hospedeiro.

Tabela I. Comparação das medidas (μm) dos esporos de *Henneguya* sp. 1 com outras espécies do gênero *Henneguya* descritas na América do Sul.

Espécie	CT	CCE	LCE	CPC	CCP	LCP	FP	TV
<i>Henneguya</i> sp. 1	34.0	14.6	6.0	19.3	6.8	1.7	12 – 13	igual
<i>Henneguya adherens</i>	32.3	12.4	5.8	20.5	3.1	1.2	3 – 4	desigual
<i>Henneguya testicularis</i>	27.5	14.0	6.5	13.5	9.0	2.0	12 – 13	desigual
<i>Henneguya curimata</i>	35.4	16.6	6.2	19.1	6.5	1.2	10 – 11	igual

CT: comprimento total; CCE: comprimento do corpo do espora; LCE: largura do corpo do espora; CPC: comprimento do processo caudal; CCP: comprimento da cápsula polar; LCP: largura da cápsula polar; FP: filamento polar; TV: tipo de valva

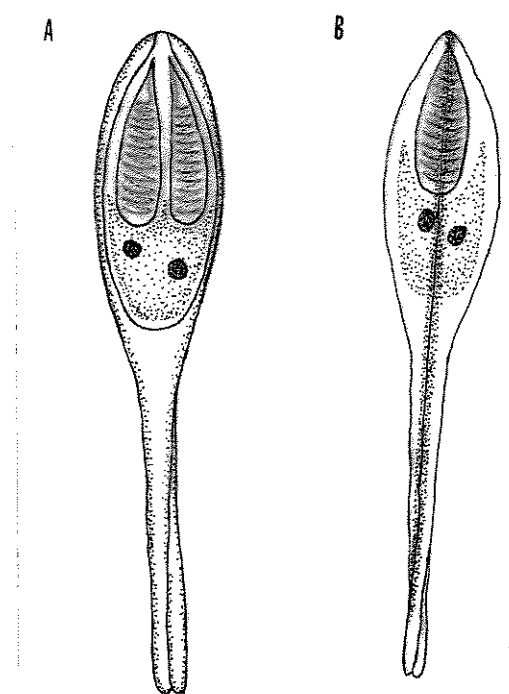


Fig. 1: Representação esquemática de um esporo maduro de *Henneguya* sp. 1. A: visão frontal; B: visão lateral. Bar = 10µm

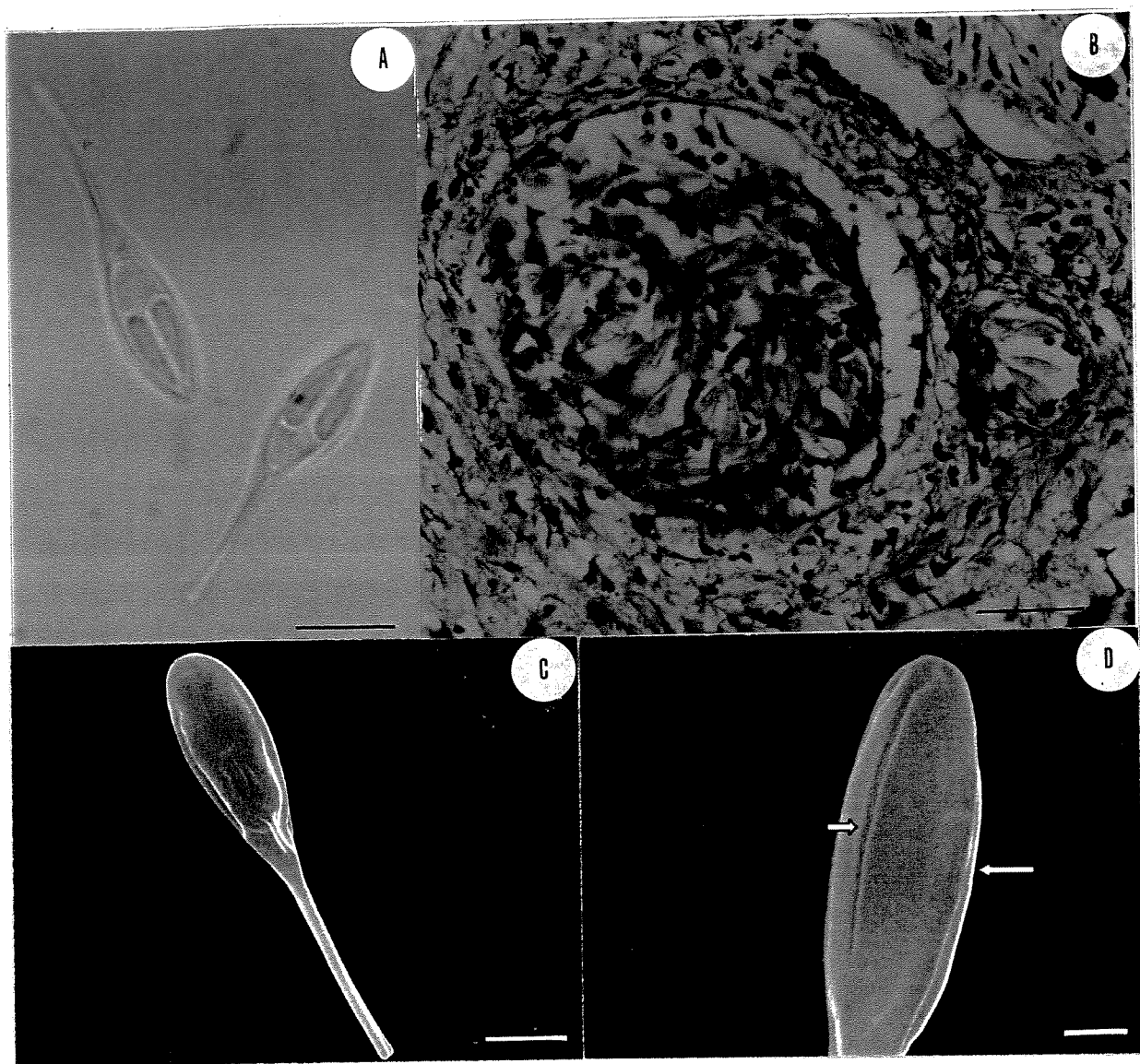


Fig. 2: *Heneguya* sp. 1 em *Astyanax altiparanae*. A: esporos em preparação a fresco. Bar = 10 μ m
B: Corte histológico da nadadeira caudal: cisto localizado no tecido conjuntivo da base dos raios da nadadeira. Bar = 30 μ m. C-D: Microscopia eletrônica de varredura. C: visão frontal. Bar = 5 μ m; D: corpo do esporo: note a presença da linha de sutura (seta longa) e de um sulco na superfície das valvas do esporo (seta curta). Bar = 2 μ m

Discussão

A forma e as dimensões dos esporos de *Henneguya* sp. 1 assemelham-se a outras 3 espécies do gênero *Henneguya* descritas em peixes de água doce da América do Sul (Tabela I): *Henneguya adherens*, descrita parasitando os filamentos branquiais de *Acestrorhynchus falcatus*, um peixe da bacia Amazônica (Azevedo & Matos, 1995), *Henneguya testicularis*, descrita parasitando os testículos de *Moenkhausia oligolepis* do rio Amazonas (Azevedo et al., 1997) e *Henneguya curimata*, descrita parasitando os rins de *Curimata inornata*, peixe também coletado da bacia Amazônica (Azevedo & Matos, 2002).

Entretanto os esporos de *Henneguya* sp. 1 diferem principalmente daqueles de *H. curimata* no comprimento do corpo do espora, na largura e no comprimento das cápsulas polares e no número de voltas do filamento polar. Os esporos de *H. adherens* assemelham-se aqueles de *Henneguya* sp. 1 na largura do corpo do espora e das cápsulas polares e no comprimento do processo caudal, mas as outras dimensões diferem. Em adição, as cápsulas polares dos esporos de *H. adherens* não apresentam as mesmas dimensões, enquanto que as cápsulas polares de *Henneguya* sp. 1 apresentam o mesmo tamanho. Finalmente, *H. testicularis* é a única espécie que possui morfologia semelhante a espécie aqui em estudo, além de apresentar o comprimento do corpo do espora similar e o mesmo número de voltas para o filamento polar. Contudo diferem nas outras dimensões.

Considerando estes dados, acreditamos que o presente material, constitui uma nova espécie do gênero *Henneguya*.

A prevalência de *Henneguya* sp. 1 nas nadadeiras de *A. altiparanae* (44,2%) foi similar a aquela apresentada por *Henneguya adherens* nas brânquias de *Acestrorhynchus falcatus* (55%).

Tanto *Henneguya curimata* como *Henneguya testicularis* apresentaram prevalências inferiores, 28,5% e 28% respectivamente.

Durante o verão foi observada a maior prevalência de infecção nas nadadeiras de *A. altiparanae*. No outono os cistos desapareceram quase que totalmente, provavelmente devido a ruptura dos mesmos. A influência do aumento da temperatura da água na ruptura dos cistos de mixosporídios, já foi assinalada por Cone (1994), em um estudo realizado do ciclo anual de *Henneguya doori*, parasito de *Perca flavescens*.

Nas estações seguintes, o número de peixes infectados por cistos ou esporos de *Henneguya* sp. 1 foi aumentando gradativamente. Desta forma podemos sugerir que *Henneguya* sp. 1, provavelmente apresenta ciclo sazonal de desenvolvimento. Entretanto, novas pesquisas devem ser realizadas, com o objetivo de determinar o período de desenvolvimento dos cistos.

A análise histológica demonstrou que os de cistos de *Henneguya* sp. 1 no tecido conjuntivo da base das nadadeiras de *A. altiparanae* não produziu resposta inflamatória no hospedeiro. Entretanto não podemos inferir que o parasito não apresenta importância patológica.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Laboratório de Microscopia Eletrônica do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, SP, Brasil, pelo uso do microscópio eletrônico e Nilson Branco (Departamento de Parasitologia / UNICAMP) pela assistência durante o trabalho de campo.

Referências

- Adriano EA, Arana S, Ceccarelli PS, Cordeiro NS 2002. Light and scanning electron microscopy of *Myxobolus porofilus* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting the visceral cavity of *Prochilodus lineatus* (Pisces: Characiformes; Prochilodontidae) cultivated in Brazil. *Folia Parasitol* 49: 249-262.
- Andrade DR, Godinho HP, Ribeiro SP, Castro EFT 1985. Ciclo reprodutivo anual de lambaris (*Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758) em viveiros. *Arq Bras Med Vet Zoot* 37: 435-447.
- Azevedo C, Matos E 1995. *Henneguya adherens* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), parasite of the Amazonian fish, *Acesthorhynchus falcatus*. *J Euk Microbiol* 42: 515-518.
- Azevedo C, Matos E 2002. Fine structure of the Myxosporean, *Henneguya curimata* n. sp., parasite of the Amazonian fish, *Curimata inornata* (Teleostei, Curimatidae). *J Euk Microbiol* 49: 197-200.
- Azevedo C, Corral L, Matos E 1997. Light and ultrastructural data on *Henneguya testicularis* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae), a parasite from the testis of the Amazonian fish *Moenkhausia oligolepis*. *Syst Parasitol* 37: 111-114.
- Barassa B, Adriano EA, Arana S, Cordeiro NS *Henneguya curvata* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae) parasiting the gills of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae: Serrasalminae), a South American freshwater fish. *Folia Parasitol*. (no prelo)
- Barbieri G, Santos MVR, Santos JM 1982. Época de reprodução e relação peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Pesq Agropec Bras Brasília* 17: 1057-1065.
- Barbieri G, Marins MA 1995. Estudo da dinâmica da reprodução de fêmeas de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) da Represa do Lobo, Estado de São Paulo (Osteichthyes, Characidae). *Arq Biol Tecnol* 38: 1191-1197.

- Casal G, Matos E, Azevedo C 1997. Some ultrastructural aspects of *Henneguya striolata* sp. n. (Myxozoa, Myxosporea), a parasite of the Amazonian fish *Serrasalmus striolatus*. *Parasitol Res* 83: 93-95.
- Cone DK 1994. Annual cycle of *Henneguya doori* (Myxosporea) parasiting yellow perch (*Perca flavescens*). *J Parasitol* 80: 900-904.
- Eiras JC 2002. Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thelohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Syst Parasitol* 52: 43-54.
- Gióia I, Cordeiro NS 1996. Brazilian Myxosporidians' Check-list (Myxozoa). *Acta Protozool* 35:137-149.
- Kostoingue B, Diebakate C, Faye N, Toguebaye BS 2001. Presence of Myxosporidea (Myxozoa: Myxosporea) of the genus *Henneguya* Théloham, 1892 in freshwater fishes from Chad (Central Africa). *Acta Protozool* 40: 117-123.
- Lom J, Arthur JR 1989. A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *J Fish Dis* 12: 151-156.
- Lom J, Vávra J 1963. Mucous envelops of spores of the subphylum Cnidospora (Doflein, 1901). *Vestn Cesk Spol Zool* 27: 4-6.
- Martins ML, Souza VN 1997. *Henneguya piaractus* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae), a gill parasite of *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae), in Brazil. *Rev Bras Biol* 57: 239-245.
- Martins ML, Souza VN, Moraes JRE, Moraes FR 1999. Gill infection of *Leporinus macrocephalus* Garavello & Bristski, 1988 (Osteichthyes: Anostomidae) by *Henneguya leporinocola* n. sp (Myxozoa: Myxobolidae) description, histopathology and treatment. *Rev Bras Biol* 59: 527-534.

Capítulo 3

Henneguya curvata sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae) parasiting the gills of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae: Serrasalminae), a South American freshwater fish

Bianca Barassa¹, Edson A. Adriano¹, Sarah Arana², and Nelson S. Cordeiro¹

¹Department of Parasitology and ²Department of Histology and Embryology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.⁺

Abstract. *Henneguya curvata* sp. n. was found parasitising the gills of *Serrasalmus spilopleura* collected in the municipality of Campinas, São Paulo State, Brazil. All specimens examined had cysts of the parasite in the gill. Mature spores were elongated (total length $41.7 \pm 2.7 \mu\text{m}$, width $4.7 \pm 0.2 \mu\text{m}$; mean $\pm$ SD). Spores body (length $16.4 \pm 0.8 \mu\text{m}$), caudal process (length $25.3 \pm 2.3 \mu\text{m}$) and valve surfaces were smooth. In lateral view, spore bodies were thin and curved, with a thin sutural line. Polar capsules were elongate (length $7.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$, width $1.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$) and the polar filament coiled in 10-11 turns arranged obliquely to the long axis. An iodophilous vacuole was present but there was no mucus envelope. The parasite formed small plasmodia, which deformed the gill structures and compressed the capillaries of the secondary lamellae. This in turn lead to fusion of the neighbouring secondary lamellae and thickening of the superficial portion of the epithelium through hyperplasia.

Key Words: Brazil; Fish; *Henneguya curvata* sp. n.; Histopathology; Myxosporea; *Serrasalmus*; *Serrasalmus spilopleura*; Piranha

⁺ Trabalho enviado para publicação na Folia Parasitologica

Introduction

The class Myxosporea of the phylum Myxozoa contains 52 genera (Kent et al. 2001), most of which parasite fishes. *Henneguya* Thélohan, 1892 is the second most common of these genera and contains more than 150 species, some of which are important pathological agents (Dyková and Lom, 1978, Kalavati and Narasimhamurti 1985, Lom and Dyková 1995, Martins et al. 1999). In South America, *Henneguya* is the most abundant genus, with 31 species. To date, three species of *Henneguya* have been reported in *Serrasalmus* spp.: *Henneguya iheringi* Pinto, 1928 parasiting *S. spilopleura* caught in the state of São Paulo, and *Henneguya striolata* Casal, Matos et Azevedo, 1997 parasitising *S. striolatus* collected in the Amazon river estuary near Belém in the state of Pará, Brazil e *Henneguya pilosa* Azevedo & Matos, 2003 parasitising *S. altuvei* a freshwater teleost collected in the Zoological Garden of the city of Teresina (Piauí) Brazil. Fish of the genus *Serrasalmus* are voracious carnivorous fish popularly known as “piranha” in Brazil and are widely distributed throughout South American rivers. In this study, we describe a new species of *Henneguya* parasitising *S. spilopleura*

Materials and Methods

Eighteen adult and juvenile specimens of *S. spilopleura* were collected locally from a lake on a farm in the municipality of Campinas, state of São Paulo, Brazil, and examined for the presence of myxosporeans. The fish were captured between January and June 2001, and transported alive to the laboratory where they were killed by transection of the spinal cord then measured and necropsied. The measurements of 30 fresh mature spores (Lom and Arthur 1989) were obtained using a micrometer incorporated into a microscope eyepiece. The dimensions were expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). India ink staining was used to detect the mucus envelope.

The spores were checked for the presence of an iodophilous vacuole after adding a drop of Lugol solution. Smears containing free spores were stained with Giemsa solution and mounted in low viscosity medium as permanent mounts (Adriano et al., 2002).

For histological analysis, portions of the gills containing plasmodia were fixed in 10% buffered formalin for 24 h, embedded in paraffin, cut into sections 4 μm thick and stained with sirius red (Adriano et al., 2002), haematoxylin and eosin and PAS. For scanning electron microscopy, free spores were deposited on a coverslip coated with poly-L-lysine and fixed for 2 h at room temperature with glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2). After washing in the same buffer, the preparations were dehydrated in ethanol, dried by CO_2 critical point drying, covered with metallic gold and examined in a JEOL JSM-5900LV microscope operated at 10 kV.

Results

Description

Henneguya curvata sp. n.

Figs 1-2

Vegetative stage. Small, white plasmodia, round or ellipsoidal measuring 0.1-0.5 mm were found in the gills of *S. spilopleura*. The plasmodia occurred in the interlamellar epithelium or the epithelium of the secondary lamellae. Plasmodia in advanced stages contained only mature spores (Fig. 1A).

Spores. Mature spores elongate ($41.7 \pm 2.7 \mu\text{m}$ long, $4.7 \pm 0.2 \mu\text{m}$ wide). In frontal view, spore body fusiform (length $16.4 \pm 0.8 \mu\text{m}$), in lateral view, thin and curved, with thin suture line (Fig. 1A). Valves thin, smooth and prolonged by long caudal process (length $25.3 \pm 2.3 \mu\text{m}$) (Figs. 1B and 2). Polar capsules elongate ($7.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$ long, $1.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$ wide). Polar filaments

coiled in 10-11 turns aligned perpendicularly to longitudinal axis of capsule. An iodophilous vacuole present no mucus envelope. Two nuclei discernible in Giemsa stained preparation.

Type host: *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Pisces: Characidae: Serrasalminae).

Site of infection: Gills.

Prevalence: 100% (18/18) of *S. spilopleura* were infected.

Type locality: Rio das Pedras farm, municipality of Campinas, São Paulo state, Brazil.

Type material: Slides with stained spores (syntypes) were deposited in the collection of the Museum of Natural History in the Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP) (Acc. N^{os}. ZUEC 06 and 07).

Etymology: The specific name refers to the curved spore body, when seen in lateral view.

Histopathology. The plasmodia occupied the interlamellar epithelium or the epithelium of the secondary lamellae and were surrounded by a thin collagen capsule (Fig. 1C). Development of the plasmodia caused deformation of the lamellar structures, including compression of the capillaries, which lead to slight edema. In advanced stages, the neighbouring secondary lamellae were pushed aside to produce fusion of the lamellae (Fig. 1D). Epithelial cells proliferated around of the plasmodia and there was thickening of the epithelial surface (Fig. 1D). The parasite did not cause cellular hypertrophy or hemorrhage.

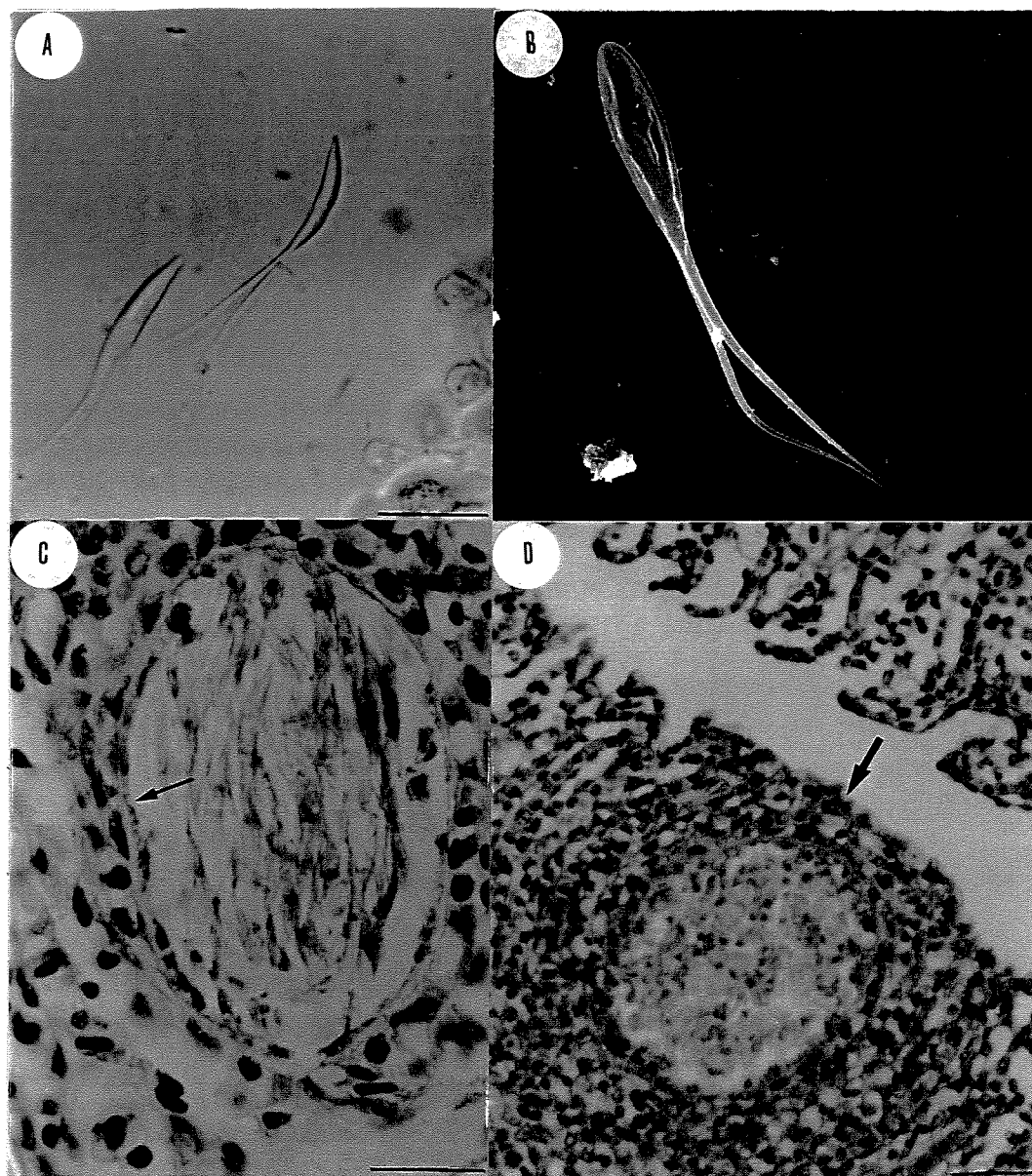


Fig. 1. *Henneguya curvata* sp. n. from piranha. A: Light photomicrograph of spores in a fresh preparation: note the thin and curved body spores seen in lateral view. Bar = 10 μ m. B: Scanning electron micrograph. Bar = 10 μ m. C-D: Histological sections of the gills. C: mature plasmodium surrounded by a thin collagen capsule (arrow). Bar = 10 μ m. D: proliferation of epithelial cells around of an immature plasmodium. Bar = 20 μ m. Sirius red stain.

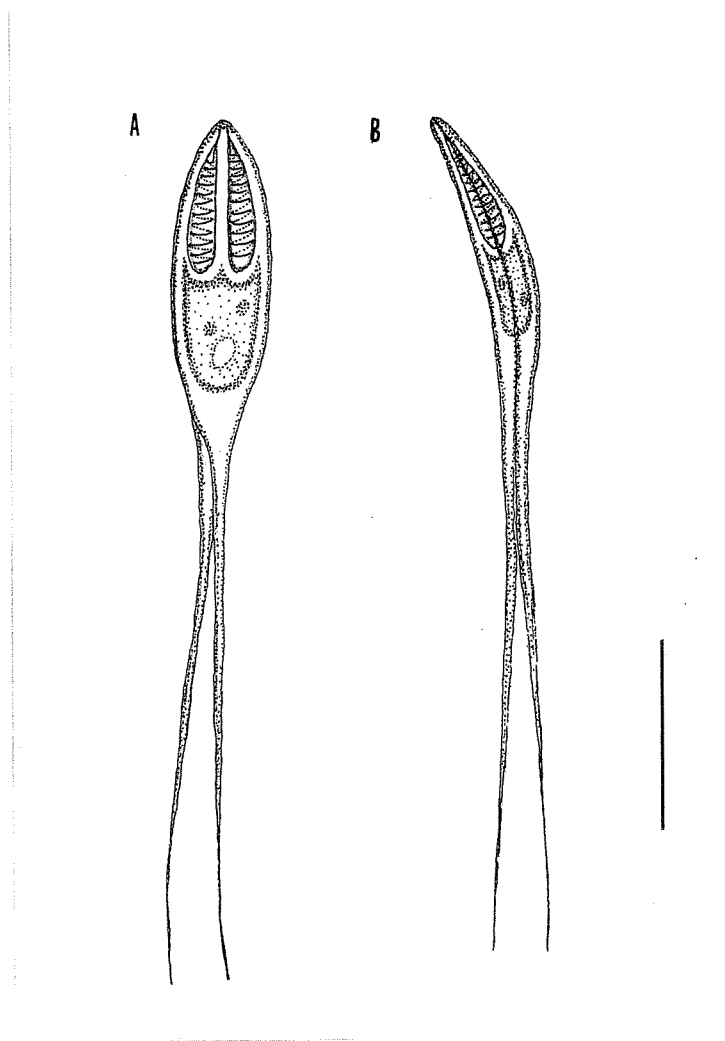


Fig. 2. Schematic representation of mature spores of *Henneguya curvata* sp. n. A: frontal view; B: lateral view. Bar = 10 μ m.

Discussion

The morphometrics of *Henneguya curvata* spore were compared with 31 other *Henneguya* species reported to date in South American fishes. Of this, only *H. visceralis* Jakowska and Nigrelli, 1953 found in *Electrophorus electricus* and *H. striolata* described in *S. striolatus* have characteristics similar to those of *H. curvata*. In lateral view, *H. curvata* spores resemble those of *H. visceralis* because of the curved body, but the spore dimensions are different. *H. striolatus* spores are similar in size and shape to those of *H. curvata*, but the spores of the latter have a curved body, larger polar capsules and the polar filaments have 10-11 turns compared to the 13-14 turns in *H. striolatus*.

The prevalence of the parasite was high (100%) when compared with other *Henneguya* species parasite of fish from natural environment from South America. In *S. striolatus* from the Amazon river, the prevalence of infection by *H. striolata* was 62.5% (Casal et al., 1997). Azevedo and Matos (1996) described *Henneguya malabarica* parasitising *Hoplias malabaricus* with a prevalence of 6,7% in the Amazon river. *Henneguya pisciforme* was described infecting *Hyphessobrycon anisitsi* with a prevalence of 20% in rivers around Campinas, São Paulo state (Cordeiro et al., 1983/84). In same region, *Henneguya intracornea* infected *Astyanax scabripinnis* with a prevalence varying from 2% to 11,5% in fishes caught at different sites (Gioia et al., 1986).

Histopathological analysis showed that development of the plasmodia produced deformation of the gill structures, with compression of the capillaries, which in some cases, lead to the development of a slight edema. In advanced stages, enlargement of the plasmodia resulted in the fusion of neighboring secondary lamellae, and the proliferation of epithelial cells with thickening of the epithelium and a consequent reduction in the respiratory area. Similar observations were

reported by Molnár (1998) for pikeperch parasitised by *Henneguya creplini*, but there was also the formation of a thick layer of granular tissue.

According to Dyková and Lom (1978), the response of fish soft tissues to myxosporidian infections involves displacement, atrophy or hyperplasia of the tissue surrounding the plasmodium during growth and maturation. In more advanced stages, when the cysts are full of mature spores, an inflammatory reaction occurs, resulting in the rapid replacement of the cysts by granulomatous tissue. In addition to the displacement of secondary lamellae and epithelial hyperplasia, Martins et al. (1999) also described epithelial displacement, hemorrhage and an intense inflammatory mononuclear infiltrate in the secondary lamellae of *Leporinus macrocephalus* infected with *Henneguya leporinicola* Martins, Souza, Moraes et Moraes, 1999. No hemorrhagic or inflammatory foci were observed in the present study, but the histopathological alterations indicated that this parasite was pathogenic since there was fusion of the neighbouring secondary lamellae with subsequent lamellar deformation, as well as proliferation of the epithelium and a loss of respiratory area. Although the low intensity of parasitaemia meant that, the alterations observed did not compromise the gill functions, a massive parasitaemia could compromise this organ by reducing the respiratory area and by compressing the blood capillaries. These changes could adversely affect the excretion of the fish since the gills are also involved in other physiological functions.

Acknowledgements

The authors thank the Laboratório de Microscopia Eletrônica at the Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, SP, for use of the electron microscope, Nilson Branco (Department of Parasitology / UNICAMP) for her assistance in the field work and Dr. Stephen Hyslop for editing of the English.



References

- ADRIANO E.A., ARANA S., CECCARELLI P.S., CORDEIRO N.S. 2002: Light and scanning electron microscopy of *Myxobolus porofilus* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting the visceral cavity of *Prochilodus lineatus* (Pisces: Characiformes; Prochilodontidae) cultivated in Brazil. *Folia Parasitol.* 49:249-262.
- AZEVEDO C., MATOS E. 1996: *Henneguya malabarica* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae) in the Amazonian fish *Hoplias malabaricus*. *Parasitol. Res.* 82:222-224.
- CASAL G., MATOS E., AZEVEDO. 1997: Some ultrastructural aspects of *Henneguya striolata* sp. n. (Myxozoa, Myxosporea), a parasite of the Amazonian fish *Serrasalmus striolatus*. *Parasitol. Res.* 83:93-95.
- CORDEIRO N. S., ARTIGAS P. T., GIOIA I., LIMA R. S. 1983/84: *Henneguya pisciforme* n. sp., mixosporídio parasito de brânquias do lambari *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Characidae). *Mem. Inst. Butantan* 47/48:61-67.
- DYKOVÁ I., LOM J. 1978: Histopathological changes in fish gills infected with myxosporidian parasites of the genus *Henneguya*. *J. Fish Biol.* 12:197-202.
- GIOIA I., CORDEIRO N. S., ARTIGAS P. T. 1986: *Henneguya intracornea* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) parasito do olho de lambari, *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Osteichthyes, Characidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 81: 401-407.
- KALAVATI C., NARASIMHAMURTI C.C. 1985: Histopathological changes in the gills of *Channa punctatus* BL. infected with *Henneguya waltirensis*. *Arch. Protistenk.* 129: 199-202.
- KENT M.L., ANDREE K.B., BARTHOLOMEW J.L., EL-MATBOULI M., DESSER S.S., DEVLIN R.H., FEIST S.W., HEDRICK R.P., HOFFMANN R.W., KHATTRA J.,

- HALLETT S.L., LESTER R.J.G., LONGSHAW M., PALENZEULA O., SIDDALL M.E.,
XIAO C.X. 2001: Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. J. Euk. Microbiol. 48:
395-413.
- LOM J., ARTHUR J.R. 1989: A guideline for the preparation of species description in
Myxosporea. J. Fish Dis. 12: 151-156.
- LOM J., DYKOVÁ I. 1995: Myxosporea (Phylum Myxozoa). In P.T.K. Woo (Ed.), Fish
Diseases and Disorders - Protozoan and Metazoan Infections. Vol. 1. CAB International, p.
97-147.
- MARTINS M.L., SOUZA V.N., MORAES J.R.E., MORAES F.R. 1999: Gill infection of
Leporinus macrocephalus Garavello & Britski, 1988 (Osteichthyes: Anostomidae) by
Henneguya leporinicola n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae). Description, histopathology and
treatment. Rev. Bras. Biol. 59: 527-534.
- MOLNÁR K. 1998: Taxonomic problems, seasonality and histopathology of *Henneguya creplini*
(Myxosporea) infection of the pikeperch *Stizostedion lucioperca* in Lake Balaton. Folia
Parasitol. 45: 261-269

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho possibilitaram as seguintes conclusões:

- 1) A análise dos tecidos e órgãos de *Astyanax altiparanae* revelou a presença de duas novas espécies de mixosporídios pertencente ao gênero *Henneguya*: *Henneguya chydadea* parasitando as brânquias, com prevalência de 88,3% e *Henneguya* sp. 1 parasitando as nadadeiras, com prevalência de 44,2%;
- 2) Dos exemplares de *A. altiparanae* examinados, 46,6% apresentaram infecção concomitante para *H. chydadea* e *Henneguya* sp. 1;
- 3) O estudo dos tecido e órgãos de *Serrasalmus spilopleura* demonstrou a presença de apenas uma nova espécie de mixosporídio, *Henneguya curvata* parasitando as brânquias, com 100% de prevalência;
- 4) A prevalência de *H. chydadea* e *Henneguya* sp. 1, em *A. altiparanae*, variou durante as estações do ano. *H. chydadea* foi mais prevalente no inverno (100%), enquanto que *Henneguya* sp. 1 foi mais prevalente no verão (90%), apresentando desta forma, possivelmente, ciclo sazonal de desenvolvimento;
- 5- A histopatologia revelou que os cistos de *H. chydadea*, localizados no epitélio da lamela secundária de *A. altiparanae*, produziram deformação das lamelas, compressão dos capilares e o afastamento das lamelas vizinhas, enquanto que os cistos de *Henneguya* sp. 1, localizados entre os raios das nadadeiras, não produziram resposta inflamatória no hospedeiro;
- 6- Os cistos de *Henneguya curvata*, localizados no epitélio interlamelar ou no epitélio das lamelas secundárias, de *S. spilopleura*, provocaram deformação das estruturas lamelares, compressão dos capilares e um leve edema. Além disso, também foi observado afastamento das lamelas vizinhas e hiperplasia.

7. *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adriano EA, Arana S, Ceccarelli PS, Cordeiro NS 2002. Light and scanning electron microscopy of *Myxobolus porofilus* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting the visceral cavity of *Prochilodus lineatus* (Pisces: Characiformes; Prochilodontidae) cultivated in Brazil. *Folia Parasitol* 49: 259-262.
- Andrade DR, Godinho HP, Ribeiro SP, Castro EFT 1985. Ciclo reprodutivo anual de lambaris (*Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758) em viveiros. *Arq Bras Med Vet Zoot* 37: 435-447.
- Azevedo C, Matos E 1995. *Henneguya adherens* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), parasite of the Amazonian fish, *Acesthorhynchus falcatus*. *J Euk Microbiol* 42: 515-518.
- Azevedo C, Matos E 1996. *Henneguya malabarica* sp. n. (Myxozoa, Myxobolidae) in the Amazonian fish *Hoplias malabaricus*. *Parasitol Res* 82: 222-224.
- Azevedo C, Matos E 2002. Fine structure of the Myxosporean, *Henneguya curimata* n. sp., parasite of the Amazonian fish, *Curimata inornata* (Teleostei, Curimatidae). *J Euk Microbiol* 49: 197-200.
- Azevedo C, Matos E 2003. Fine structure of *Henneguya pilosa* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea), parasite of *Serrasalmus altuvei* (Characidae) in Brasil. *Folia Parasitol* 50: 37-42.
- Azevedo C, Corral L, Matos E 1997. Light and ultrastructural data on *Henneguya testicularis* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae), a parasite from the testis of the Amazonian fish *Moenkhausia oligolepis*. *Syst Parasitol* 37: 111-114.
- Azevedo C, Corral L, Matos E 2002. *Myxobolus desaequalis* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), parasite of the Amazonian freshwater fish, *Apteronotus albifrons* (Teleostei, Apteronotidae). *J Euk Microbiol* 49: 485-488

* As referências bibliográficas estão de acordo com as normas das Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

- Barassa B, Adriano EA, Arana S, Cordeiro NS 2003. *Henneguya curvata* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae) parasiting the gills of *Serrasalmus spilopleura* (Characidae: Serrasalminae), a South American freshwater fish. *Folia Parasitol* (no prelo)
- Barbieri G, Barbieri MC 1988. Curva de maturação, tamanho de primeira maturação gonadal e fecundidade de *Astyanax bimaculatus* e *Astyanax fasciatus*, da represa do Lobo, Estado de São Paulo (Osteichthyes, Characidae). *Rev Ceres* 35: 64-77.
- Barbieri G, Marins MA 1995. Estudo da dinâmica da reprodução de fêmeas de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) da Represa do Lobo, Estado de São Paulo (Osteichthyes, Characidae). *Arq Biol Tecnol* 38: 1191-1197.
- Barbieri G, Santos MVR, Santos JM 1982. Época de reprodução e relação peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Pesq Agropec Bras Brasília* 17: 1057-1065.
- Böhlke JE, Weitzman SH, Menezes NA 1978. Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. *Acta Amazonica* 8: 657-677.
- Buckup PA 1998. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of Characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In PTK Woo, *Fish Diseases and Disorders - Protozoan and Metazoan Infections*, Vol. 1, Cab International, p. 123-147.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *J Parasitol* 83: 575-583.
- Braga RA 1975. *Ecologia e etologia de piranhas no nordeste do Brasil (Pisces-Serrasalmus Lacépède, 1803)*, 2th ed., Banco do Nordeste do Brasil, Fortaleza, 268pp.
- Canning EU, Curry A, Feist SW, Longshaw M, Okamura B 2000. A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryosalmonae (PKX organism). *J Euk Microbiol* 47: 456-468.

- Casal G, Matos E, Azevedo C 1996. Ultrastructural data of the life cycle stages of *Myxobolus braziliensis* n. sp., parasite of an Amazonian Fish. *Europ J Protistol* 32: 123-127.
- Casal G, Matos E, Azevedo C 1997. Some ultrastructural aspects of *Henneguya striolata* sp. n. (Myxozoa, Myxosporea), a parasite of the Amazonian fish *Serrasalmus striolatus*. *Parasitol Res* 83: 93-95.
- Casal G, Matos E, Azevedo C 2002. Ultrastructural data on the spore of *Myxobolus maculatus* n. sp. (phylum Myxozoa), parasite from the Amazonian fish *Metynnis maculatus* (Teleostei). *Dis Aquat Organ* 51: 107-112.
- Casal G, Matos E, Azevedo C 2003. Light and electron microscopic study of the myxosporean, *Henneguya friderici* n. sp. from the Amazonian teleostean fish, *Leporinus friderici*. *Parasitology* 126: 313-319.
- Cellere EF, Cordeiro NS, Adriano EA 2002. *Myxobolus absonus* sp.n. (Myxozoa: Myxosporea) parasiting *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae), a South American freshwater fish. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 79-80.
- Cordeiro NS, Artigas PT, Gióia I, Lima RS 1983/84. *Henneguya pisciforme* n. sp., myxosporídio parasito de brânquias do lambari *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Characidae). *Mem Inst Butantan* 47/48: 61-69.
- Dyková I, Lom J 1978. Histopathological changes in fish gills infected with myxosporidian parasites of the genus *Henneguya*. *J Fish Biol* 12:197-202.
- Eiras JC 1994. *Elementos de Ictioparasitologia*, Ed. Fundação Eng. António de Almeida, Porto-Portugal, 339 pp.
- Eiras JC 2002. Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thelohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Syst Parasitol* 52: 43-54.

- Esteves KE 1996. Feeding ecology of three *Astyanax* species (Characidae, Tetragonopterinae) from a floodplain lake of Mogi-Guaçu river, Paraná river basin, Brazil. *Environ Biol Fish* 46: 83-101.
- Ferraz de Lima CLB, Reis NS, Ceccarelli PS, Bozano GLN 1995. Modificações histológicas associadas com infecção por *Henneguya* sp. (Protozoa, Myxosporea) em pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Teleostei, Serrasalminae). *B Téc CEPTA* 8: 13-23.
- Garutti V, Britski HA 1997. Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Teleostei, Characidae), com mancha umeral horizontalmente ovalada, da bacia do rio Guaporé, Amazônia. *Papeis Avul Zool São Paulo*. 40: 217-229.
- Garutti V, Britski HA 2000. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comum Mus Ciênc Tecnol*, PUCRS, Porto Alegre.13: 65-88.
- Garutti V, Figueiredo-Garutti MLV 1992. Caracterização de populações do lambari *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) procedentes do campus de Jaboticabal, Unesp, SP. *Naturalia São Paulo* 17: 17-29.
- Gióia I, Cordeiro NS 1996. Brazilian Myxosporidians' Check-list (Myxozoa). *Acta Protozool* 35:137-149.
- Kalavati C, Narasimhamurti CC 1985. Histopathological changes in the gills of *Channa punctatus* BL infected with *Henneguya waltirensis*. *Arch Protistenk* 129: 199-202.
- Kent ML, Andree KB, Bartholomew JL, El-Matbouli M, Dessler SS, Delvin RH, Feist SW, Hedrick RP, Hoffmann RW, Khattri J, Hallett SL, Lester RJG, Longshaw M, Palenzeula O, Siddall ME, Xiao CX 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J Euk Microbiol* 48: 395-413.

- Lom J 1987. Myxosporea: a new look at long – known parasites of fish. *Parasitol Today* 3: 327-332.
- Lom J, Arthur JR 1989. A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *J Fish Dis* 12: 151-156.
- Lom J, Dyková L 1995. Myxosporea (Phylum Myxozoa). In PTK Woo, *Fish Diseases and Disorders - Protozoan and Metazoan Infections*, Vol. 1, Cab International, p. 87-147.
- Lom J, Vávra J 1963. Mucous envelopes of spores of the subphylum Cnidospora (Doflein, 1901). *Vestn Cesk Spol Zool* 27: 4-6.
- Martins ML, Souza VN 1997. *Henneguya piaractus* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae), a gill parasite of *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae), in Brazil. *Rev Bras Biol* 57: 239-245.
- Martins ML, Souza VN, Moraes JRE, Moraes FR 1999a. Gill infection of *Leporinus macrocephalus* Garavello & Bristski, 1988 (Osteichthyes: Anostomidae) by *Henneguya leporinocola* n. sp (Myxozoa: Myxobolidae) description, histopathology and treatment. *Rev Bras Biol* 59: 527-534.
- Martins ML, Souza VN, Moraes JRE, Moraes FR, Costa AJ 1999b. Comparative evaluation of the susceptibility of cultivated fishes to the natural infection with myxosporean parasites and tissue changes in the host. *Rev Bras Biol* 59: 263-269.
- Molnár K, Ranzani-Paiva MJ, Eiras JC, Rodrigues EL 1998. *Myxobolus macroplamodialis* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea), a parasite of the abdominal cavity of the Characid Teleost, *Salminus maxillosus*, in Brasil. *Acta Protozool* 37: 241- 245.
- Nelson JS 1984. *Fishes of the World*, 2 ed, John & Sons, New York, 523 pp.
- Nelson JS 1994. *Fishes of the World*, 3 ed, John & Sons, New York, 600 pp.

- Nomura H 1975. Comparação dos caracteres merísticos de três espécies de peixes do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Osteichthyes, Characidae) do rio Mogi Guaçu, São Paulo. *Rev Bras Biol* 35: 805-836.
- Oliveira RD, Nogueira FMB 2000. Characterization on the fishes and of subsistence fishing in the Pantanal of Mato Grosso, Brasil. *Rev Bras Biol* 60: 435-445.
- Rajendran KV, Vijayan KK, Alavandi SV 1998. Cardiac myxosporiosis of pearl-spot, *Etrophus suratensis* (Bloch), due to *Myxobolus etropi* sp. n. *J Fish Dis* 21: 169-176.
- Salim KY, Desser SS 2000. Descriptions and phylogenetic systematics of *Myxobolus* spp. from Cyprinids in Algonquin Park, Ontario. *J Eukiot Microbiol* 47: 309-318.
- Sazima I, Machado FA 1990. Underwater observations of piranhas in western Brazil. *Env Biol fish* 28: 17-31.
- Schaefer SA 1998. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidea: Loricariidae). In LR Malabarba, RE Reis, RP Vari, ZMS Lucena, CAS Lucena (eds), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 375-400.
- Thatcher VE 1981. Patologia de peixes da Amazônia Brasileira, 1. Aspectos gerais. *Acta Amazônica* 11: 125-140.
- Vital P, Corral L, Matos E, Azevedo C 2003. Ultrastructural aspects of the myxosporean *Henneguya astyanax* n. sp. (Myxozoa: myxobolidae), a parasite of the Amazonian teleost *Astyanax keithi* (Characidae). *Dis Aquat Organ* 53: 55-60.

8. ANEXO

FICHA DE COLETA

DATA DA COLETA: ____/____/____ **PEIXE Nº:** _____

Nome genérico: _____ Nome científico: _____

Comprimento: _____ Peso: _____

Sexo: _____

Órgãos Parasitados: _____

Forma parasitária: () Cisto () Esporo

Gênero: _____ Espécie: _____

Observações: _____

Órgãos Parasitados: _____

Forma parasitária: () Cisto () Esporo

Gênero: _____ Espécie: _____

Observações: _____
