

UNVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

RAYLINE THAIMENNE ALVES FIGUEREDO

Diversidade e interação parasito-hospedeiro de Myxozoa parasitos de Ciclídeos da bacia amazônica

Campinas

2023

RAYLINE THAIMENNE ALVES FIGUEREDO

Diversidade e interação parasito-hospedeiro de Myxozoa parasitos de Ciclídeos da bacia amazônica

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Biologia Animal, na área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.

Orientador: DR. EDSON APARECIDO ADRIANO

Co-Orientadora: Dra. MARIA ISABEL MÜLLER

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA RAYLINE THAIMENNE ALVES FIGUEREDO E ORIENTADA PELO PROF. DR. EDSON APARECIDO ADRIANO.

Campinas

2023

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Biologia Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F469d	Figueredo, Rayline Thaimenne Alves, 1991- Diversidade e interação parasito-hospedeiro de Myxozoa parasitos de Ciclídeos da bacia amazônica / Rayline Thaimenne Alves Figueredo. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.
	Orientador: Edson Aparecido Adriano. Coorientador: Maria Isabel Müller. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Cnidários. 2. Myxozoa. 3. Myxosporea. 4. Relação hospedeiro-parasito. Microscopia eletrônica de transmissão. 6. Filogenia. I. Adriano, Edson Aparecido, 1970 II. Müller, Maria Isabel, 1982 III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Diversity and host-parasite interection of Myxozoa cichlid parasites from the Amazon basin Palavras-chave em inglês: Cnidarians Myxozoa Myxosporea Host-parasite relationships Transmission electron microscopy Phylogeny Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia Titulação: Mestra em Biologia Animal Banca examinadora: Edson Aparecido Adriano [Orientador] Marlene Tiduko Ueta Maria José Tavares Ranzani de Paiva Data de defesa: 13-01-2023 Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0003-4100-9039 - Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/1466630270971213

Campinas, 13 de janeiro de 2023

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Aparecido Adriano

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta

Profa. Dra. Maria José Tavares Ranzani de Paiva

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Ruth Farias e ao meu avô Mercidio Alves, responsáveis pela minha formação como pessoa e principais incentivadores na busca dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua mão protetora que me sustenta e me guia pelos melhores caminhos!

A minha melhor amiga, intercessora, companheira e incentivadora de toda minha trajetória, minha mãe Ruth Farias, sem ela nada disso seria possível. Obrigada por tornar meus objetivos, seus!

Aos meus familiares, que sempre me apoiaram, especialmente meu avô, obrigada pelos ensinamentos e pelo apoio à busca dos meus objetivos, independentes das circunstâncias. Eu jamais teria conseguido as orações de vocês!

Aos meus queridos orientadores Prof. Dr. Edson Adriano e Co-Orientadora Prof.^a Dra. Maria Isabel Muller, sou extremamente grata pela vida de vocês, obrigada por todo apoio, pelos ensinamentos, e pela imensa paciência durante o desenvolvimento desse projeto. Vocês são exemplos de amizade, companheirismo e profissionalismo!

A professora Dra. Michele Velasco, pelo incentivo científico desde o início da graduação. Obrigada por tudo!

Um agradecimento especial a Glaucia Ferreira, que mesmo longe, esteve ao meu lado, me apoiando e me incentivando a ser sempre uma pessoa melhor. Nossos quase vinte anos de amizade é prova de tudo isso. Não consigo expressar o carinho que eu sinto por você!

Aos meus queridos amigos: Cidneya, Luana, Darlene, Marcelly e Luan, que apesar da distância, sempre arrumaram um jeito de me fazer senti-los perto nos momentos importantes e difíceis. Obrigada por sempre estarem aqui!

Ao grupo de Myxozoa da Unifesp: Geusivam, Lincoln e Juliana, que sem dúvida foram pessoas que me acolheram, me ensinaram e tornaram todo trabalho de campo mais leve.

A FAPESP, pelo suporte financeiro aos projetos que possibilitaram a execução das coletas de campo e o desenvolvimento desta pesquisa – Processo 19/17427-3.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A bacia Amazônica é a maior bacia hidrográfica da América do Sul e comporta rica ictiofauna. Como parte desta ictiofauna, peixes da Família Cichlidae são importantes na pesca comercial extrativista e na pesca de subsistência das comunidades ribeirinhas. Ciclídeos de pequeno porte com formas e cores variadas, como Caquetaia spectabilis, Geophagus altifrons e Satanoperca jurupari são também comumente exploradas pelo setor de aquarismo. Entre os patógenos que acometem espécies de peixes amazônicos, aqueles da classe Myxozoa, e que são cnidários adaptados ao endoparasitismo, vêm recebendo grande destaque científico nos últimos anos. O presente estudo teve como objetivo avançar no estudo da diversidade e da interação parasito-hospedeiro em infecções de mixozoários em C. spectabilis, G. altifrons e S. jurupari. Trinta e um exemplares, distribuídos entre as três espécies, foram capturados e examinados na região do encontro dos rios Tapajós e Amazonas, no município de Santarém, Estado do Pará. Dos 11 espécimes examinados de C. spectabilis, 3 (27,2%) apresentaram infecção por *Henneguya* sp. 1. O desenvolvimento dos plasmódios ocorreu em tecidos da superfície do opérculo, das nadadeiras, e olhos. As análises morfológicas, histológicas, ultra estruturais e moleculares permitiram identificar o parasito como uma espécie ainda não descrita. As análises histológicas mostraram o desenvolvimento do parasito nos tecidos conjuntivos dos órgãos. Análises ultra estruturais revelaram numerosos e extensos canais de pinocitose conectando o meio externo à região do ectoplasma, bem como invaginações na membrana dos plasmódios. Plasmódios contendo esporos característicos do gênero Ceratomyxa foram encontrados na vesícula biliar de 9 (64,2%) dos 14 espécimes examinados de G. altifrons. Os plasmódios apresentaram formato vermiforme e motilidade ondulatória ao longo de toda extensão. A análise ultra estrutural revelou que estes plasmódios são compostos por uma camada externa de citoplasma, que encerra mitocôndrias e diferentes estágios de desenvolvimento esporogônico, e uma região interna ocupada por um extenso vacúolo. Nas análises de distância genética, Ceratomyxa sp. 1 apresentou diferença de 0,2% para Ceratomyxa amazonensis, mostrando tratar-se da mesma espécie, mas ocorrendo em um novo hospedeiro. Nos exemplares de S. jurupari, também na vesícula biliar, foram encontrados pseudoplasmódios dispóricos com características do gênero *Ellipsomyxa* em 2 (33.3%) dos 6 exemplares examinados. As análises ultra estruturais revelaram que os pseudoplasmódios imaturos apresentam intensa atividade de expansões que resulta na formação de estruturas semelhantes a pseudópodes. Para Ellipsomyxa sp. 1 os dados moleculares revelaram 1,6% de distância

genética para *Ellipsomyxa amazonensis* e *Ellipsomyxa paraensis*. Associando esses dados com as características morfológicos, foi possível identificar *Ellipsomyxa* sp. 1 como um novo *taxon* dentro do gênero *Ellipsomyxa*. Análises filogenéticas mostraram que tanto *Henneguya* sp. 1 quanto *Ellipsomyxa* sp. 1 agruparam em subclados composto por espécies de Myxozoa parasitos de peixes de água doce da região amazônica.

Palavras-chave: Cnidários, Endocnidozoa, Myxosporea, microscopia eletrônica de transmissão, filogenia.

ABSTRACT

The Amazon basin is the largest hydrographic basin in South America and harbors a rich ichthyofauna. As part of this ichthyofauna, fish of the Cichlidae Family are important in commercial extractive fisheries and subsistence fisheries in riverside communities. Small cichlids with varied shapes and colors, such as Caquetaia spectabilis, Geophagus altifrons and Satanoperca jurupari are also commonly exploited by the aquarium industry. Among the pathogens that affect species of Amazonian fish, the Myxozoa class, which are cnidarians adapted to endoparasitism, have received great scientific attention in recent years. The present study aimed to advance knowledge of the diversity and parasite-host interaction of myxozoans in C. spectabilis, G. altifrons and S. jurupari. Thirty-one specimens, distributed among the three species, were caught, and examined in the region where the Tapajós and Amazon rivers merge, in the municipality of Santarém, Pará State, Brazil. Eleven specimens of C. spectabilis were examined and 3 (27.2%) were infected with *Henneguya* sp. 1. The development of the plasmodia occurred in the surface of the operculum, in fins, and eyes. The morphological, histological, ultrastructural, and molecular analyzes revealed that this species was not described yet. Histological analyzes showed the development of the parasite was in the connective tissues of the organs. Ultrastructural analyzes revealed the plasmodia with numerous and extensive pinocytosis channels connecting the external environment to the ectoplasm region, as well as invaginations in the plasmodial membrane. Plasmodia containing characteristic spores of the genus Ceratomyxa were found in the gallbladder of 9 (64.2%) of the 14 examined specimens of G. altifrons. Plasmodia showed worm shape and undulatory motility along the entire length. Ultrastructural analysis revealed that these plasmodia were composed of an outer layer of cytoplasm, which harbors mitochondria and different stages of sporogonic development, and an inner region occupied by an extensive vacuole. The genetic distance analysis, *Ceratomyxa* sp. 1 showed a difference of 0.2% in relation to *Ceratomyxa amazonensis*, thus corresponding as the same species, but occurring in a new host. In specimens of S. jurupari, also in the gallbladder were observed the occurrence of dysporic pseudoplasmodia with characteristics of the genus Ellipsomyxa in 2 (33.3%) of the 6 specimens examined. Ultrastructural analyzes revealed that immature pseudoplasmodia present intense activity of expansions, that results in the formation of pseudopod-like structures. For Ellipsomyxa sp. 1, molecular data revealed 1.6% of genetic distance for Ellipsomyxa amazonensis and Ellipsomyxa paraensis. Adding these molecular data to morphological features, it was possible to identify *Ellipsomyxa* sp. 1 as

a new taxon within the genus *Ellipsomyxa*. Phylogenetic analyzes showed that both novel taxa *Henneguya* sp. 1 and *Ellipsomyxa* sp. 1 grouped into subclades composed of Myxozoa species parasites of freshwater fish from the Amazon region.

Keywords: Cnidarians, Endocnidozoa, Myxosporea, transmission electron microscopy, phylogeny.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO
2.	OBJETIVOS
	2.1 Objetivo Geral14
	2.2 Objetivos Específicos15
3.	MATERIAL E MÉTODOS
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO 17
5.	CAPÍTULO 1: Host-parasite relationship and phylogenetic analyses of <i>Henneguya</i> sp. 1 (Cnidaria: Myxozoa) parasite of the Amazonian cichlid fish <i>Caquetaia spectabilis</i>
	5.1 Introduction
	5.2 Materials and methods19
	5.3 Results
	5.4 Discussion
	5.5 References
6.	CAPÍTULO 2: Mixozoários celozóicos da familia Ceratomyxidae parasitando de peixes ciclídeos de amazônicos de interesse em aquarismo43
	6.1 Introdução44
	6.2 Material e Métodos45
	6.3 Resultados
	6.4 Discussão
	6.5 Referências60
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS65
9.	ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

A família Cichlidae é composta por espécies de água doce e ocasionalmente estuarina das Américas Central e do Sul (uma espécie estendendo-se até o Texas), Oeste e costa da Índia, África, Madagascar, Israel, Síria e Sri Lanka, totalizando cerca de 1747 espécies válidas (Nelson et al., 2016; Fricke et. al.,2020). Dentre os ciclídeos encontra-se um grupo importante de peixes ornamentais relativamente grandes e muitas vezes coloridos, tendo sido muitos padrões de cores desenvolvidos através da reprodução seletiva em algumas das espécies, especialmente para o comércio visando o aquarismo (Nelson et al., 2016).

Entre os ciclídeos sul-americanos que apresentam importância no aquarismo, temos *Caquetaia spectabilis* Steindachner 1875, *Geophagus altifrons* Heckel, 1840 e *Satanoperca jurupari* Heckel, 1840, que são comumente encontrados na bacia amazônica e conhecidos popularmente como acará rosado, acaratinga e demônio comedor de terra, respectivamente (Santos et al., 2009; Silvano et al., 2020; Ferreira, et al., 2021). São peixes bentopelágicos, onívoros que podem atingir de 19 cm de comprimento no caso de *C. spectabilis* e 26 cm nos casos de *G. altifrons* e *S. jurupari* (Froese & Pauly 2022).

Os peixes, em condição natural ou em sistemas de criação, são hospedeiros de uma variedade de parasitos pertencentes a diferentes grupos taxonômicos, com algumas espécies responsáveis pelo desenvolvimento de doenças que causam danos às populações hospedeiros e à produção de peixes (Feist & Longshaw, 2006).

Entre os parasitos de peixes, cnidários da Classe Myxozoa Grassé, 1970 (mixozoários), estão entre os mais comuns (Schmahl, et al., 1989). Em 2017, a Classe incluía 2.596 espécies, o que representa cerca de 20% das espécies de cnidários conhecidos (Okamura et al., 2018). Pela patogenicidade de algumas espécies, ou pela grande diversidade e complexidade do ciclo biológico, a pesquisa de mixozoários tem se intensificado no contexto internacional (Okamura et al. 2015). Estes cnidários são endoparasitos obrigatórios, com ciclos biológicos complexos (Fig. 1) que envolvem hospedeiros invertebrados (anelídeos ou briozoários) e hospedeiros vertebrados, que são majoritariamente peixes, mas também podem ocorrer em anfíbios, répteis e algumas espécies de aves aquáticas e mamíferos terrestres (Eiras et al. 2005; Lom & Dyková, 2006; Bartholomew et al. 2008; Székely et al. 2015).



Figura1– Ciclo biológico típico de espécies e subclasse Myxosporea. A – Anelídeo (hospedeiro definitivo); B – Actinosporo; C – Peixe (hospedeiro intermediário); D – Mixosporo. Fonte: Adaptado de Chang et al. (2015).

Dentre os mixozoários, a Subclasse Myxosporea Bütschli, 1881 (mixosporídeos) alberga várias espécies responsáveis pelo desenvolvimento de doenças em peixes comercialmente importantes. Atualmente são conhecidos 61 gêneros de Myxosporea (Fiala et al., 2015), sendo os mais especiosos os gêneros *Myxobolus* Bütschli, 1882, *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 e *Henneguya* Thélohan, 1892 (Eiras & Adriano, 2012; Eiras et al., 2014; 2018). A espécie mais conhecida é *Myxobolus cerebralis* (Hofer, 1903), que causa a doença do rodopio em salmonídeos, sendo fator importante no decréscimo da produção e no aumento dos custos de produção (Feist & Longshaw, 2006; Okamura et al., 2015). No Brasil, espécies do gênero *Henneguya* são as mais comuns (Adriano et al., 2022). Dentre elas, algumas se destacam por causar danos em peixes com grande apelo comercial: *Henneguya piaractus* Martins & Souza, 1999, foi relatado causando dilatação das lamelas infectadas, com discreta hiperplasia epitelial em *Piaractus mesopotamicus*

em pisciculturas brasileiras (Adriano et al 2005); *Henneguya pseudoplatystoma* Naldoni, Arana, Maia, Ceccarelli, Tavares, Borges, Pozo & Adriano, 2009, produz redução da área de epitélio funcional nas brânquias em híbridos resultantes do cruzamento entre *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma fasciatum* produzidos em pisciculturas (Naldoni et al. 2009).

Espécies do gênero *Ceratomyxa* infectam principalmente vesícula biliar de peixes marinhos, mas estudos recentes têm demonstrado a existência de uma diversidade de espécies infectando peixes de água doce no Brasil, principalmente na bacia amazônica (Eiras et al., 2018, Adriano et al., 2021). As espécies descritas no Brasil apresentam plasmódios singulares e foram descritos primeiramente por Adriano & Okamura (2017). Tais plasmódios apresentam formato vermiforme e movimentos ondulatórios similares àqueles observados nos Nematoda, sendo que essa motilidade tem como base elementos do citoesqueleto presentes no citoplasma, como actina e microtúbulos associados a um vacúolo hidrostático na região central do plasmódio (Adriano et al., 2021).

Outro gênero encontrado dentro de Myxosporea é o *Ellipsomyxa* Køie, 2003. Atualmente, o gênero soma menos de duas dezenas de espécies, e até 2018, eram conhecidos como parasitos apenas de peixes marinhos e estuarinos (Zatti et al., 2018). Desde então, 5 espécies foram descritas na vesícula biliar de peixes de água doce, na Amazônia (Zatti et al., 2018; 2020; Silva et al., 2018; Ferreira et al., 2021). O gênero *Ellipsomyxa* pertencente à família Ceratomyxidae (Køie, 2003), mas existem muitos questionamentos sobre esse posicionamento, havendo sugestões de que o grupo seja mais próximos do gênero *Myxidium* do que de *Ceratomyxa* (Gunter et al., 2009; Heiniger e Adlard 2014; Fiala et al., 2015).

2. OJBETIVOS

2.1 Geral

Investigar a diversidade de cnidários da Classe Myxozoa parasitos de C. *spectabilis, G. altifrons* e S. *jurupari*, ciclídeos da Bacia Amazônica.

2.2 Específicos

• Identificar, a partir de análises morfológicas e do sequenciamento da pequena subunidade do DNA ribossomal (SSU-rDNA) as espécies de mixozoários encontrados infectando ciclídeos amazônicos alvos do estudo.

• Analisar, mediante análises histopatológicas e ultra estruturais, aspectos da relação-parasito hospedeiro visando identificar as alterações induzidas pelos mixozoários nos respectivos hospedeiros ciclídeos alvos do estudo.

3. MATERIAL E METODOS

Este projeto foi desenvolvido no laboratório de Genética Evolutiva do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP, Campus Diadema. O material biológico foi coletado em outubro de 2021 e janeiro e setembro de 2022 na região do encontro entre os rios Amazonas e Tapajós (Figuras 2 e 3), no município de Santarém, Estado do Pará. As coletas foram autorizadas pelo Ministério do Meio Ambiente - SISBio nº. 67616-1 e as eutanásias realizadas conforme autorização do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP nº6549290920.



Figura 2 – Local de coleta (círculo) na região do encontro dos rios Amazonas e Tapajós, em Santarém, Estado do Pará. Foto: Edson A. Adriano.



Figura 3– Fotos mostrando atividade de coleta e exemplares de peixes capturados. A: Pescador lançando tarrafa nas margens do Rio Amazonas (Foto-Edson A. Adriano); B: *Caquetaia spectabilis*; C: *Geophagus altifrons*; D: *Satanoperca jurupari* (Fotos – Rayline T.A. Figueredo).

Após a eutanásia foi realizada a análise externa nos peixes, buscando lesões e/ou cistos de parasitos. Posteriormente foi realizada a necropsia e os órgãos examinados com auxílio de estereomicroscópio e microscópio de luz. Fragmentos de órgãos contendo cistos e os fluidos da vesícula biliar contendo parasitos foram fixados conforme cada técnica a ser empregada para os estudos posteriores (microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão, histologia e análises moleculares), como descritos na seção resultados e discussão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento deste estudo foi identificada a ocorrência de espécies pertencentes aos gêneros *Henneguya*, *Ceratomyxa* e *Ellipsomyxa* em ciclídeos da Bacia Amazônica. Para caracterização dos parasitos foram utilizadas abordagens morfológicas, histológicas, ultra estruturais e moleculares. Os dados resultantes dessas análises estão descritos em forma de artigo nos capítulos a seguir.

5. CAPÍTULO 1: Host-parasite relationship and phylogenetic analyses of *Henneguya* sp. 1 (Cnidaria: Myxozoa) parasite of the Amazonian cichlid fish *Caquetaia spectabilis*

Abstract

The present study describes a new species of *Henneguya* infecting the ornamental fish Caquetaia spectabilis in the Brazilian Amazon. The fish specimens were captured in the Tapajós River, in the state of Pará. The infection was intense, with several plasmodia spread on the external and internal opercular surfaces, fin, mouth and eyes, the description was performed through morphology, histopathology, transmission electron microscopy and sequencing of small subunit ribosomal DNA (SSU-rDNA). Plasmodia were white round and ellipsoidal in frontal view and had a total length of 40.6 µm (34.2-54.6), the spore body measured 20.5 µm (14.4-32.3) in length, 7.9 µm (6.2-10.8) in width and 6.7 μ m (6.0 - 7.6) in side view. The two polar capsules were elongated and equal in size, measuring 4.3 µm (3.3-5.4) in length and 2.1 µm (1.3-2.8) in width, making it impossible to observe the polar tubules. Histopathological analysis revealed the parasite in the connective tissue of the fin, eyes and operculum. If lamatory infiltrate was observed only in inefections of the eyes. Ultrastructural analyzes revealed a single plasmodial wall, which was in direct contact with the host cells and had numerous projections towards the host cells, as well as extensive pinocytotic channels. A layer of fibrous material and few mitochondria were found in the ectoplasm. Generative cells and the early stage of sporogenesis were seen more internally. The SSU-rDNA based phylogeny showed the new species in a well-sustained subclade of *Henneguya* spp. infecting cichlids.

5.1 Introduction

Cnidarians of the genus *Henneguya* Thélohan 1892 belong to the Family Myxobolidae of the class Myxozoa, and nowadays more than 200 species are known worldwide (Eiras & Adriano, 2012). Among the species reported so far infecting fish from the Amazon basin (Eiras, 2002; Eiras & Adriano, 2012; Rocha et al., 2014; Videira et al., 2015; Mathews et al., 2016; Velasco et al., 2016), seven were reported in Cichlids: *Henneguya amazonica* Rocha, Matos & Azevedo, 1992, from gill lamellae of *Crenicichla lepidota; Henneguya aequidens* Videira, Veslasco, Azevedo, Silva, Gonçalves & Matos, 2015, from gill filaments of *Aequidens plagiozonatus; Henneguya paraensis* Velasco, Videira, Nascimento, Matos, Gonçalves & Matos, 2016, from gill filaments of *Cichla temensis; Henneguya tapajoensis* Zatti, Atkinson, Maia, Bartholomew & Adriano, 2018, from *Cichla monoculus* fins; *Henneguya tucunarei* Zatti, Atkinson, Maia, Bartholomew & Adriano, 2018, from gill filaments of *Cichla monoculus*, and *Henneguya sacacaensis* Ferreira, Silva, Araújo, Hamoy, Matos & Videira, 2020, in the gill filaments of *Satanoperca jurupari*.

Considering the trade in aquarium fish worldwide, the majoritarity of ornamental fishes is from freshwater origin and farm-raised (Livengood & Chapman, 2020). However, the largest diversity of species is found in natural environments, and Amazon basin is an important source of this variety (Moreau & Coomes, 2006; Junk et al., 2007; Anjos et al., 2009). In the amazonian waters, among the fish targeted in the aquarium hobby, we highlight *Caquetaia spectabilis* Steindachner in 1875. It is a carnivore cichlid fish endemic to the basins of the Amazon, popularly known as *acará* or *acará-rosado* in Portuguese and as rose acara in English, attain up to 25 cm, has big mouth too protractile, and occurs in lentic waters (Santos et al., 2009).

As myxosporeans are common parasites in fish and some species have great pathogenic potential (Kent et al., 2001; Feist & Longshaw, 2006; Feist, 2008), this study focused on the taxonomic, phylogenetic, ultrastructural and histophatologic analyses of a species from the genus *Henneguya* found infecting specimens of *C. spectabilis* cautch in the Amazon Basin, Brasil.

5.2 Materials and methods

Eleven specimens of *C. spectabilis* were examined from the region where Amazon and Tapajós rivers merge, municipality of Santarém, State of Pará, Brazil (2°23'49.79''S

54°43'53.33W). The fish were caught in october 2021, january and august of 2022 using fishing nets and transported alive to a field laboratory settled near by the river. Sampling and access to genetic heritage was authorized by the Brazilian Ministry of the Environment (SISBIO authorization #67616-2 and SisGen #A656D, respectively). The methodology of this study was approved by Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of São Paulo-UNIFESP (CEUA n°6549290920).

Still in the field, fish surface and their organs were examined under a stereomicroscope (Carl Zeiss model Stemi 2000) and a light microscope (Carl Zeiss model Primo Star). When infected, the fish were photographed using a digital camera (Sony CyberShot) coupled to the light microscope objective, and tissue fragments containing plasmodia were fixed in 10% buffered formalin for morphological and histopathological analyses, in 2.5% buffered glutaraldehyde for ultrastructural analysis, and in 100% ethanol for DNA analysis, and taken to the Laboratory of Evolutionary Genetic-UNIFESP. The parasites were examined and photographed using a Carl Zeiss Axio Imager A2 ligh microscope equipped with differential interference contrast (DIC) equipped with Axio Cam and AxioVision AxioVs 40V4.8.2 software. Thirty-five myxospores were measured using the AxioVision AxioVs 40V4.8.2 software package, following the criteria established by Lom e Arthur (1989). All measurements are expressed in μ m as means \pm stander daviation (SD) and ranges in parentheses.

For histological analysis, fragments of infected organs fixed in 10% buffered formalin were embedded in paraffin, sectioned with a thickness of 4 μ m and stained with hematoxylin-eosin and picrosirius. For ultrastructural analysis, samples fixed for at least 12h in 2.5% glutaraldehyde diluted in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) were washed in the same buffer and post-fixed with osmium tetroxide (OsO4), dehydrated in an ascending ethanol series, and embedded in EMbed 812 resin (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA). Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined under the Morgagni 268D transmission electron microscope of the Center for Advanced Diagnostic Imaging (CADI), Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science at the University of São Paulo – USP.

Total DNA was extracted from the ethanol-fixed samples using a Qiagen DNeasy Kit (QIAGEN, Califórnia, EUA), following the manufacturer's instructions. PCR amplification of the fragments of the small-subunit ribosomal DNA (SSU-rDNA) was obtained through two-round aproaching. The first round was carried out using ERIB1-ACCTGGTTGATCCTGCCAG and ERIB10-CTTCCGCAGGTTCACCTACGG

primers (Barta et al., 1997), followed by a second round that consisted of a semi-nested using ERIB1 paired with ACT1r-AATTTCACCTCTCGCTGCCA (Hallett & Diamant, 2001) and Tedf-AATTACCCAATCCAGACAAT (Capodifoglio et al., 2015) paired with ERIB10. PCRs were conducted in 25 µl reaction volumes comprised of 12.5 µl DreamTag Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), 0.5 µl each primer (10 pmol), 3 µl DNA (10 ng/µl), and 8.5 µl ultrapure water. It consisted of an initial step at 95 °C for 2 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, annealing at 58 °C for 30 s (60° C second round) and extension at 72 °C for 2 min, followed by a terminal extension at 72 °C for 7 min. The amplicons were analyzed via electrophoresis Tris-borate-EDTA (0.045 M Tris - borate, 1.5% agarose gel 0.001 M EDTA, pH 8.0) stained with SYBR[™] Safe (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) and analyzed on a Compact Digimage System transilluminator (MajorScienceTM). The presence of amplicons of the expected size was confirmed by direct comparison with the molecular weight marker 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). The amplicons were then purified using the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, California, EUA) according to the manufacturer's instructions, and directly sequenced using the same PCR primers (5 pmol), plus the primers MC5-CCTGAGAAACGGCTACCACATCCA and MC3-GATTAGCCTGACAGATCACTCCACGA 2002), (Molnár, aiming to overlapping DNA fragments of the central part of the SSU rDNA sequence. Sequencing was performed using a BigDye 102 Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, California, USA) in an ABI 3730 DNA 103 Analyzer (Applied Biosystems, California, USA) at the Human Genome and Stem Cell Research Center - University of São Paulo – USP. Sequences were read with a Life Technologies - Applied Biosystems ABI 3730 DNA genetic analyzer and were assembled and edited to obtain a single consensus sequence for each specimen using Geneious 7.1.3. (Kearse et al., 2012), then submitted to GenBank.

Alignment was carried out using the sequences of *Myxobolus*, *Henneguya* and *Thelohanellus* species closest to those newly generated herein, based on a BLAST search. All other sequences of South American species were also used in the analysis, even those not closely related in the BLAST search. The outgroups chosen were *Ceratomyxa vermiformis* KX278420 and *Ceratomyxa amazonensis* KX236169. Sequences were aligned using the default parameters of the Muscle algorithm (Edgar, 2004) performed in Geneious 7.1.3. To evaluate substitution saturation, the aligned matrix was tested and the

Iss index was estimated using the DAMBE 5 software package (Xia, 2013). The best-fit model for the nucleotide evolution in the resulting matrixes was determined using the Akaike information criterion in the jModelTest software package (Posada, 2008) with GTR + I + G indicated for the dataset. Phylogenetic analyses were performed using Bayesian Inference (BI) and Maximum Likelihood inference (ML) using resources available in the CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010). Bayesian analysis employed the following nucleotide substitution model settings for both datasets: lset nst = 6, rates = invariable, ncat = 4, shape = estimate, inferrates = yes, and basefreq = empirical. For the Markov chain Monte Carlo (MCMC) search, chains were run with 10,000,000 generations, saving one tree every 1500 generations. On the burn-in, the first 25% of generations were discarded and the consensus tree (majority rule) was estimated using the remaining topologies; only nodes with posterior probabilities greater than 90% were considered well supported. Maximum Likelihood inference (ML) was implemented using RAxML (Guindon & Gascuel, 2003) with bootstrap support values of 1000 repetitions, and only nodes with bootstrap values greater than 70% were considered well supported. The trees were visualised using FigTree v.1.3.1 (Rambaut, 2009).

5.3 Results

Three of 11 (27.2%) *C. spectabilis* specimens presented plasmodia of an undescribed species of the genus *Henneguya*. The plasmodia were observed in the external and internal opercular surface, fins, mouth, and eyes (Fig. 1).

Morphological data

White, round to ellipsoidal polysporic plasmodia of *Henneguya* sp. 1 were found in the eyes, operculum, and dorsal fin (Fig. 1). Formalin-fixed mature myxospores had ellipsoidal shape in the frontal view, measuring total length 40.6 μ m (ranger 34.2 – 54.6 μ m) average spore body length 20.5 μ m (ranger 15 – 27 μ m), average width 7.9 μ m (ranger 6.2 – 10.8 μ m). Valve cells extended to equal length caudal processes, average length 20.5 μ m (ranger 14.4 - 32.3) in width, and with a thickness of 6.7 (ranger 6.0 – 7.6 μ m, N= 7) μ m in the lateral view. Two polar capsules of equal size were arranged obliquely to each other measuring 4.3 μ m (3.3 –5.4 μ m) in length and 2.1 μ m (1.3–2.8 μ m) in width (Table 1. Fig. 2). It was not possible to observe the polar tubules.



Fig. 1: Photos of specimens of *Caquetaia spectabilis* infeted by *Henneguys* sp. 1 showing: **A**: plasmodia in the eye (black arrow) and pectoral fin base (white arrows). Scale bar: 10 mm; **B**: in the dorsal fin. Scale bar: 5 mm; and **C**: in the annal fin. Scale bar: 2 mm.



Fig. 2: *Henneguya* sp. 1 parasite of *Caquetaia spectabilis*. **A**: Photomicrographs of mature myxospores under DIC. Front view showing two polar capsules (white arrows) caudal projection (empty arrows) and myxospore in lateral view (black arrow). Scale bar: 20 μm. **B**: Mixosporo maduro com observação das cápsulas polares (seta branca) e projection caudal (seta vazio). Scale bar: 10 μm. **C**: Schematic drawing of a myxospore. Scale bar: 10 μm.

Table 1: Comparison of myxospore dimensions *Henneguya* species described from the Amazon basin. Dimensions are given in micrometers and expressed as the mean \pm standard deviation followed by the range in parentheses.

			Spore (µm)			Polar ca	psules (µm)	NDE		
Species	TL	BL	AppL	BW	Т	L	Ŵ	NPF	Type host and site of infection	Type locality/referece
Henneguya sp. 1 (this study)	40.6± 6.7 (34.2- 54.6)	20.5 ± 3.9 (15-27)	20.5 ± 5.6 (14.4-32.3)	$7.9 \pm 1.0 (6.2 - 10.8)$	6.7 ± 2.5 (6.0-7.6)	$4.3\pm 0.6\;(3.3\text{-}5.4)$	2.1 ± 0.3 (1.3-2.8)	-	Caquetaia spectabilis, eyes, operculum and dorsal fin.	Tapajós River, Pará, Brazil
Henneguya sacacaensis (Ferreira et al., 2020)	46.5 ± 5.47	30 ± 6.87	16.5 ± 2.64	5.1 ± 0.94	-	3.83 ± 0.31	1.6 ± 0.20	7-9	Satanoperca jurupari, gill filaments	Curiaú River, Amapá, Brazil
Henneguya tucunarei (Zatti et al. 2018)	43.8 ± 4.1 (36.1-49.6)	14 ± 0.8 (12.1-15.7)	28.1 ± 4.3 (19.6-35.6)	6.1 ± 0.7 (4.9–7.8)	_	3.4 ± 0.5 (2.5-4.6)	1.98 ± 0.3 (1.3-2.6)	3–4	Cichla monoculus, gill filaments	Tapajós River, Pará, Brazil
Henneguya tapajoensis	54.6 ± 3.9	16.4 ± 1.2 (14.5, 10, 1)	39 ± 3.9	7 ± 0.4	5 ± 0.1	4.2 ± 0.5	2.1 ± 0.4	4–5	Cichla pinima, gill filaments	Tapajós River, Pará, Brazil
<i>Henneguya jariensis</i>	(47.2-02.2) 46.7 ± 1.5 (43.9, 49.2)	(14.5-19.1) 13.4 ± 0.7 (11.9, 14.6)	(31.7 - 40.5) 33.16 ± 1.7 (30.2 - 37)	(5.7-9.5) 6.5 ± 0.5 (4.9,7.3)	(4.0-5.1)	(2.7-5) 4 ± 0.3 (34, 4, 3)	(1.3-2.3) 2 ± 0.1 (1.7, 2.4)	4	Cichla monoculus, fins	Jari River, Amapá, Brazil
<i>Henneguya paraensis</i> (Velasco et al. 2016)	(43.3 ± 0.35) (41.65 - 42.95)	(11.9-14.0) 12.8 ± 0.42 (12.38-13.22)	(30.2-37) 29.5 ± 0.73 (28.77-30.23)	(4.9-7.5) 8.6±0.32 (8.18-8.92)	-	(3.4 ± 0.16) (6.67-7.56)	(1.7-2.4) 2.6 ± 0.08 (2.52-2.68)	5–7	Cichla temensis, gill filaments	Tocantins River, Pará, Brazil
<i>Henneguya melini</i> (Mathews et al. 2016)	40.8 ± 0.3 (40.3-41.1)	(12130 + 15122) 15.5 ± 0.2 (15.3 - 15.70)	25.30 ± 0.10 (25.2-25.4)	4.7 ± 0.1 (4.6-4.8)	-	4.8 ± 0.5 (4.3-5.3)	1.7 ± 0.3 (1.4-2)	5-6	Corydoras melini, gill filaments	Negro River, Amazonas Brazil
<i>Henneguya aequidens</i> (Videira et al. 2015)	41±1.5	15±0.9	27 ± 0.6	6± 0.8	_	3± 0.3	3±0.3	4–6	Aequidens plagiozonatus, gill filaments	Peixe Boi River, Pará, Brazil
Henneguya torpedo (Azevedo et al. 2011)	48.62 ± 0.51 (48.3-48.9)	28.53 ± 0.36 (28.3-30.1)	19.64 ± 0.44 (19.2-19.9)	7.25 ± 0.31 (7-7.5)	3.06 ± 0.2 (2.9-3.1)	6.41 ± 0.26 (6.3-6.6)	1.84 ± 0.19 (1.7-1.9)	5-6	Brachyhypopomus pinnicaudatus, brain and spinal cord	Peixe Boi River, Pará, Brazil
(Azevedo et al. 2009)	19.7 ± 0.9	10.8 ± 0.5	3.3 ± 0.4	8.7 ± 0.62	2.5 ± 0.5	3.5 ± 0.39	1.0 ± 0.2	5 - 6	Hemiodopsis microlepis, secondary gill lamellae	Poty River, Piauí, Brazil
(Feijó et al. 2008)	51.6 ± 3.4 (48.4–53.1)	14.2 ± 0.8 (13.5-15.2)	38.3 ± 2.9 (38-41.2)	5.7 ± 0.5 (5.1-6.1)	4.9 ± 0.2 (4.7–5.3)	6.5 ± 0.2 (6.3-6.8)	6.3±0.1 (6.3–6.8) 6.3±0.1 (6.2–6.6)	5	Araipama gigas, gill arch and gall bladder	Araguaia River, Goiás, Brazil
Henneguya rondoni (Azevedo et al. 2008)	17.7	7 (6.8–7.3)	10.7	3.6 (3-3.9)	2.5 (2 2-2 8)	2.5 (2 2-2 8)	0.85	6–7	Gymnorhamphichthys rondoni, lateral perves	Amazonas River, Pará, Brazil
(Matos et al. 2005) Henneguya rhamdia (Matos et al. 2005)	50 ± 1.8	13.1 ± 1.1	36.9 ± 1.6	5.2 ± 0.5	-	4.7 ± 0.4	1.1±0.2	10-11	Rhandia quelen, gill filaments	Peixe Boi River, Pará, Brazil
<i>Henneguya schtzodon</i> (Eiras et al. 2004)	28.9 (27–30)	13.1 (12–14)	16.3 (15–17)	3.3 (3–4)	-	5.4 (5-6)	1.3 (1–1.5)	8-10	Schtzodon fasciatum, kidney	Amazonas River Amazonas, Brazil,
Henneguya friderici (Casal et al. 2003)	33.8 (28.7–39.3)	10.4 (9.6–11.8)	23.3 (19.1–28.7)	5.7 (4.8–6.6)	4.9	4.9 (4.25–5.9)	2.1 (1.59–2.62)	7–8	Leporinus friderici, gills, gut, kidney, and liver	Amazonas River, Pará, Brazil
Henneguya astyanax (Vital et al. 2003)	47.8 ± 0.71	15.2 ± 0.77	32.6 ± 1.11	5.7 ± 0.71	4.2 ± 0.31	5.0 ± 0.13	1.5 ± 0.07	8–9	Astyanax keith, gill filaments	Amazonas River, Pará, Brazil
<i>Henneguya pilosa</i> (Azevedo & Matos, 2003)	54.2 (52.3– 56.0),	21.1 (20.0–13.1),	31.1 (30.5– 34.9)	5.9 (5.5–6.5)	_	7.4 (7.1–7.6)	1.2 (1.0–1.3)	11-13	Serrasalmus altuvei, Tissues surrounding skeletal structures of the gills	Zoological Garden, Piauí, Brazil
<i>Henneguya curimata</i> (Azevedo & Matos, 2002)	35.4 (34.2–36.1)	16.6 (16–17.4)	19.1 (18.3–19.9)	6.2 (5.8–6.6)	_	3.3 ± 0.02 (2.7–3.6)	1.5 ± 0.04 (1.1-1.9)	10-11	Curimata inormata, kidney	Amazonas River, Pará, Brazil
Henneguya testicularis	27.5	14	13.5	6.5	-	9	2(2–2.5)	12–13	Moenkhausia oligolepis, testicle	Amazonas River, Pará, Brazil
(Azevedo et al. 1997)	(27–28.5)	(14–14.5)	(13–14.5)	(6-6.5)		(8.5–9.5)				
Henneguya malabarica	28.3	12.6	17.1	4.8×3.6	_	3.7	1.8	6–7	Hoplias malabaricus,	Estuarine region, Pará, Brazil
(Azevedo & Matos, 1996)	(26.6–29.8)	(11.8–13.1)	(16.2–18.9)	5.0		(3.0-4.5)	(1.6-2.2)	2.4	gill filaments	A
Henneguya adherens	32.5	12.4	20.5	5.8	_	3.1	1.2	5-4	Acestrorhynchus falcatus, gill	Amazonas Kıver, Amazonas,
(Azevedo & Matos, 1995)	(30.7 - 35.1) 59.3 ± 0.56	(10.5 - 13.8) 13.9 ± 0.16	(18-21.7) 45.4 ± 0.61	(5.1-6.5) 57+0.06		(2.8–3.5)	(1-1.6) 15+0.04		filaments	Brazil
(Rocha et al. 1992)	(55-65.9)	(11.5 ± 0.10)	(41.7-52.1)	(5.7 ± 0.00)	-	3.3 ± 0.02	(1.1 ± 0.04)	6	Crenlcichla lepldota, gill lamellae	Amazonas River,
	(55 (55.7)	(11.5-14.7)	(41.7 52.1)	(3.2 0.3)			(1.1 1.7)			Amazonas, Brazil

TL: total spore length; BL: spore body length; AppL: caudal appendages length; W: width; T: thickness; L: polar capsules length; W: polar capsules width; NPT: number of polar tubule coils; Dashes: no data.

Histopathological

The histopathological analysis of the infection of *C. spectabilis* by *Henneguya* sp. 1 revealed that in the opercula and fins the plasmodial development was in the connective tissue of the dermis (Fig. 3a-c). The plasmodia were surrounded by a delicate connective tissue capsule whose innermost layer, in contact with the parasites, is more cellular and composed by elongated cells with a heterochromatic nucleus. The outermost layer is made up of collagen fibers typical of dense connective tissue (Fig. 3a-c). In these sites of infection, no inflammatory infiltrate was observed, and there is no involvement of other tissues and structures. In the yes, the plasmodia of the parasite were observed in the connective tissue of the cornea, observable in cuts anterior to the ocular structure (Fig. 4a-d). The plasmodia also were surrounded by connective tissue capsule, with the same features of those observed in the other infections sites (Fig. 4b-d). The presence of ruptured plasmodium and free myxospores in the connective tissue were observed (Fig. 4b-c). It is also possible to observe mild inflammatory infiltrate, with immune defense cells dispersed throughout the corneal connective tissue (Fig. 4b and d).



Fig. 3. Photomicrographs of histological sections of tissues of specimens of *Caquetaia spectabilis* infected by *Henneguya* sp. 1. A: Dorsal fin with several plasmodia (p). Rays (r), collagenous tissue (cg). Scale bar: 200 μ m; B: Connective tissue of the operculum with two plasmodia, one small at the top and the other larger in the center (black arrows). Scale bar: 200 μ m; C: part of a plasmodium of the operculum showing the delicate tissue capsule connective. Note the presence of fibrocyte nuclei (black arrow). Scale bar: 50 μ m. Staining: Giemsa.



Fig. 4. Photomicrographs of histological sections of the eye of specimens of *Caquetaia spectabilis* infected by *Henneguya* sp. A: Corneal cyst (black arrow). Scale bar: 500 μ m. **B:** Magnified area of **A** (dotted region) showing free myxospores (black arrow) and inflammatory infiltrates in corneal tissue (white arrows); **C:** myxospores free (black arrow) and two small plasmodia (p); and **D:** myxospores of o broken plasmodia (black arrow). Scale bar: 20 μ m. Staining: **A-C**: Giemsa; **D:** PAS.

Ultrastructural analysis

The transmission electron microscopy revealed the plasmodia of *Henneguya* sp. 1 were surrounded by a layer of connective tissue composed by collagenous fibers and cellular components (Fig. 5a-c). The plasmodial membrane presented numerous and extensive pinocytosis channels linking the external environment to the plasmodial ectoplasm (Fig. 5b-c). Plasmodial invaginations towards the ectoplasm regions were also observed (Fig. 5a-b). In the ectoplasm was observed the presence of a conspicuous layer of slightly electron dense fibrous material that occurred along the entire periphery of the plasmodium wall (Fig. 5a-c). Below this fibrous material layer were observed early sporogenesis stages, dysporic pansporoblasts with immature myxospores, and in the deeper regions mature myxospores (Fig. 6a-b).



Fig. 5. Electron micrographs of the fin of *Caquetaia spectabilis* infected by *Henneguya* sp. 1. A: Parasite-host interface showing host tissue (H), plasmodial membrane (empty arrows), ectoplasm (ec), microfiber layer (f) and mitochondria (white arrow). In the deepest region of the plasmodium (P) young myxospores are observed in stages of development sporogonic (ys) an immature myxospore (sp). Scale bar: 5 μ m. **B**: Region showing the plasmodial membrane (white arrow) with evident invaginations (black arrows) Scale bar: 1 μ m. **C**: Note plasmodial membrane (empty arrows), numerous pinocytosis channels (wide arrows) and the microfiber layer (f). Scale bar: 2 μ m.



Fig. 6. Electron micrographs of *Henneguya* sp. 1 parasite of *Caquetaia spectabilis*. A: Section of pansporoblast (pb) containing two immature myxospores (sp). Note sporoplasm (spp) and its nucleus (n), mitochondria (black arrows), polar capsule (white arrow) valve cells (v). Scale bar: Bar 5 μ m. B: Cross section of immature myxospore at sporoplasm level (spp), pansporoblast membrane (empty arrow), valves (v) with valvogenic cell nucleus (nv), valve junction region (wide white arrows) and binucleate sporoplasm (n) with mitochondria (thin white arrows) and vacuole (vc). Scale bar: 2 μ m.

Phylogenetic analyses

Molecular analysis of SSU-rDNA from *Henneguya* sp. 1 resulted in a sequence with 1612 nucleotides which, according to BLAST, did not correspond to any myxozoan sequence available in GenBank.

Phylogenetic analysis of ML and BI based on a total of 48 South American taxa with 1007 nucleotides revealed identical topologies, which resulted two main clades well supported by posterior probability (PP) and Bootstrap (B) (Fig. 7). Clade A was formed by *Myxobolus* spp. parasites from different host families, such as: Pimelodidae, Characidae, Byconidae and Prochilodontidae, and *Thelohanellus marginatus* Rocha, Casal, Garcia, Matos, Al-Quraishy & Azevedo, 2014, which are parasites of Siluriformes. Clade B was formed by several subclades involving *Myxobolus* spp. and *Henneguya* spp., in which *Henneguya* sp. 1 grouped as sister taxa of a lineage of myxosporean parasites of Cichlids (Figure 7).



Fig. 7. Maximum likelihood phylogenetic tree based on partial SSU-rDNA sequences of South American freshwater Myxobolidae. Respectively Bayesian Inference (BI) posterior probabilities and Maximum likelihood (ML) bootstrap values >70% are shown in the nodes. GenBank accession numbers are noted after species names.

5.4 Discussion

Several cichlids fish have been described as hosts of *Henneguya* species in recent years (Ferreira et al., 2020; Zatti et al., 2018; Velasco et al., 2016). However, to date, there are no records of *C. spectabilis* infected by this parasite group.

The morphology of *Henneguya* sp. 1 was compared with freshwater *Henneguya* species described in the Amazon basin (Rocha et al., 1992; Azevedo & Matos, 1995; Casal et al., 1997; Vita et al., 2003; Feijó et al., 2008; Videira et al., 2015; Zatti et al., 2018) and from other regions (Eiras et al., 2002, Eiras & Adriano, 2012).

Concerning the Amazonian species, Henneguya sp. 1 resembles Henneguya melini Mathews, Maia & Adriano, 2016, parasite of gill filaments of Corydoras melini Lönnberg & Rendahl, 1930 (Siluriformes, Callichthyidae) regarding the myxospores total length e polar capsules length (40.6 x 40.8 and 4.3 x 4.8µm, respectively) while for Henneguya pilosa Azevedo & Matos, 2003, parasite of Serrasalmus altuvei Ramírez, 1965 (Characiformes: Serrasalmidae), the likeness was restrict to the myxospores body length (20.5 x 21.1 μ m). Among the species parasites of cichlids fish, the resemblances of Henneguya sp. 1 to Henneguya tucunarei Zatti, Atkinson, Maia, Bartholomew & Adriano, 2018 were related to myxospores total length and polar capsules width (40.6 x 43.8 and 2.1 x 1.98 µm). For *Henneguya* paraensis Velasco, Videira, Nascimento, Matos, Gonsalves & Matos, 2016, was related only to the myxospores total length (40.6 x 42.3 µm). While for Henneguya tapajoensis Zatti, Atkinson, Maia, Bartholomew & Adriano, 2018, the morphological similarities were related to myxospores body width and polar capsules length and width (7.9 x 7, 4.3 x 4.2, and 2.1 x 2.1 µm, respectively). Among the South American species out from the amazon region, the higher resemblance of Henneguya sp. 1 was to Henneguya pisciforme Cordeiro, Artigas, Gióia & Lima, 1983, parasite of Psalidodon anisitsi (Eigenmann, 1907) - (Syn. Hyphessobrycon anisitsi) (Characiformes, Characidae) regarding myxospores body and polar capsules length (20.5 x 20.4 and 4.3 x 4.2 µm). However, despite these punctual morphological similarities for these and for other Henneguya species around the world, Henneguya sp. 1 differs in terms of some other morphological data, genetic data (when available), biological and ecological traits. Thus, this study proposes Henneguya sp. 1 as a new Myxozoa taxon.

Numerous plasmodia of *Henneguya* sp. 1 were observed in the eyes, operculum, and fin, and histological analyzes showed that their development took place in the connective tissue of the organs, a common feature in myxosporens infection (Sitjá-Bobadilla, 2008; Adriano et al., 2006; Molnár et al., 2006), and demonstrating that this *Henneguya* species affinity for this

tissue, in distinct organs. This picture is similar to that observed in *Myxobolus cordeiroi* Adriano, Ceccarelli, Silva & Maia, 2009, that also developed in connective tissue, however, occurring in several organs of *Zungaro jahu* from the Brazilian wetland Pantanal. In *Henneguya* sp. 1, the plasmodia were surrounded by a thin layer of connective tissue, however, no inflammatory infiltrates were observed, nor involvement of tissues and structures present in the fins and operculum, in a similar condition reported in *Henneguya visibilis* Moreira, Adriano, Silva, Ceccarelli, Maia, 2014, whose plasmodia develop in the connective tissue of the fin of *Leporinus obtusidens* (Moreira et al., 2014). On the other hand, in the eyes of *C. spectabilis*, plasmodia of *Henneguya* sp. 1 also develop in the connective tissue of the cornea, and a mild inflammatory infiltrate was observed, with immune defense cells dispersed throughout the corneal connective tissue. Also, in the eye was observed free myxospores, apparently resulted of the rupture of plasmodium, which lead to the immune response (Fig. 4b-c).

Ultrastructure analyzes have been used as a main pathway for understanding the interface of the plasmodial membrane versus host tissue, given the importance of studies to understand the host-parasite interaction, since it can be distinct in different myxosporeans (Barassa et al., 2012; Adriano et al., 2005; El-Mansy & Bashtar, 2002; Current & Janovy, 1976). Our ultrastructural data show plasmodial membrane in direct contact with the host cells, in addition to the observation of multiple pinocytic channels connecting the outside to the ectoplasm of the parasite, a characteristic already observed in other studies involving species of the genus Henneguya (Naldoni et al., 2009; Adriano et al., 2005; Azevedo & Matos, 2002, El-Mansy & Bashtar, 2002). The pinocytic channels are directly related to the transport of nutrients (Hallett & Diamant, 2001), playing an important role to supply adequate nutrition for the different sporogonic developmental stages taking place into the plasmodia, as point previously observed by Moreira et al. (2014), Naldoni et al. (2011) and El-Mansy & Bashtar (2002). In addition, several invaginations were observed in the plasmodial membrane, which consequently increases the contact area with host cells. For studies that seek to understand the parasite-host interaction, the knowledge of the structure of the plasmodium membrane is of paramount importance, as it facilitates the understanding of the stress caused by the parasite in the host, in addition to showing important characteristics of this group (El-Mansy & Bashtar, 2002).

Inside the plasmodium, it was possible to observe an extensive layer of fibrous material, resembling actin aggregation. It is known that actin is one of the proteins that play an important role as the main component of the cytoskeleton of a eukaryotic cell (Kabsch &

Vandekerckhove, 1992). This fibrous material has also been observed in *Henneguya pseudoplatystoma* Naldoni, Arana, Maia, Ceccarelli, Tavares, Borges, Pozo & Adriano, 2009, *Henneguya eirasi* Naldoni, Arana, Maia, Silva, Carriero, Ceccarelli, Tavares & Adriano, 2011, and *Henneguya cuniculator* Naldoni, Maia, Silva & Adriano. In these parasites, as also in the plasmodia of *Henneguya* sp. 1, seems that this actin aggregation in the periphery is part of the plasmodial cytoskeleton, providing support to it (Naldoni et al., 2009, 2011, 2014). Finally, just below this actin aggregation, ultrastructural analyses showed generating cells and early sporogonic stages, followed by immature and mature myxospores in the subsequent layers.

The phylogenetic tree obtained in this study clearly distinguished *Henneguya* sp. 1 of other *Henneguya* spp. with sequences available in the NCBI database. Its evolutionary affinity comprises that this new *Henneguya* species as sister of a lineage of congeners parasites reported infecting cichlids fish. This result supports recent studies suggesting that host species is an important phylogenetic indication for grouping species in the Neotropical region (Carriero et al., 2013; Capodifoglio et al., 2016; Müller et al., 2022).

Given the great economic importance of cichlids and the lack of knowledge about the pathogens that affect them, the report of the new *Henneguya* sp. 1 infecting an economically important species in the ornamental fish trade, may be of considerable importance in the management of *C. spectabilis* in the aquarium environment. Furthermore, ornamental fish trade has been considered important pathway for spreading of myxosporeans (Biosecurity, 2005; Hallett et al., 2015) and this kind of result serve as a warning for the ornamental fish market as a whole, bringing light to the constant risk of pathogens introduction via fish aquarium trade, as previously stressed by Mathews et al. (2018).

5.5 References

Adriano, EA; Arana, S; Alves, AL; Silva, MRM; Ceccarelli, PS; Henrique-Silva, F; Maia, AAM. (2009). *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: Morphology, phylogeny and histopathology, Veterinary Parasitology, Volume 162, Issues 3–4,2009, Pages 221-229, ISSN 0304-4017, DOI: <u>https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.030</u>.

Adriano, EA; Arana, S; Cordeiro, NS. (2005). An ultrastructural and histopathological study of *Henneguya pellucida* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. Parasite 12(3):221–227. DOI: https://doi.org/10.1051/parasite/2005123221.

Adriano, EA; Arana, S; Cordeiro, NS. (2006). Histopathology and ultrastructure of *Myxobolus cuneus* n. sp. infecting the connective tissue of *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) cultivated in Brazil. Parasite 13, 137–142. DOI: <u>https://doi.org/10.1051/parasite/2006132137</u>.

Anjos, HDB; Souza, AM; Siqueira, JA. & Anjos, CR. (2009). Exportação de peixes ornamentais do estado do Amazonas, Bacia Amazônica, Brasil. *Boletim do instituto de Pesca*, *35*(2), 259-274.

Azevedo, C. & Matos, E. (2002). Fine structure of the myxosporean, *Henneguya curimata* n. Sp., parasite of the Amazonian fish, *Curimata inormata* (Teleostei, Curimatidae). J Eukaryot Microbiol 49(3):197–200. DOI:https://doi.org/10.1111/j.1550-08.2002.tb00522.x.

Azevedo, C. & Matos, E. (2003). Fine structure of *Henneguya pilosa* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea), parasite of *Serrasalmus altuvei* (Characidae), in Brazil. *Folia parasitologica*, *50*(1), 37-42.

Azevedo, C; Casal, G; Matos, P; Matos, E. (2008). A new species of Myxozoa, *Henneguya rondoni* n. Sp. (Myxozoa), from the peripheral nervous system of the Amazonian fish, Gymnorhamphichthys rondoni (Teleostei). J Eukaryot Microbiol 55(3):229–234. DOI: https:// doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00317.x.

Azevedo, C; Casal, G; Matos. P; Alves, A; Matos, E. (2011). *Henneguya torpedo* sp. nov. (Myxozoa), a parasite from the nervous system of the Amazonian teleost *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (Hypopomidae). Dis Aquat Org 93(3):235–342. DOI: <u>https://doi.org/10.3354/dao02292.</u>

Azevedo, C; Casal, G; Mendonça, I. & Matos, E. (2009). Fine structure of *Henneguya hemiodopsis* sp. n. (Myxozoa), a parasite of the gills of the Brazilian teleostean fish *Hemiodopsis microlepes* (Hemiodontidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104,* 975-979.

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(2):111–114. DOI: <u>https://doi.org/10.1023/A:1005793930837</u>.

Azevedo, C; Matos, E. (1995). *Henneguya adherens* n. Sp. (Myxozoa, Myxosporea), parasite of the Amazonian fish, *Acestrorhynchus falcatus*. J Eukaryot Microbiol 42(5):515–518. DOI: <u>https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1995.tb05898.x</u>.

Azevedo, C; Matos, E. (1996). *Henneguya malabarica* sp. nov. (Myxozoa, Myxobolidae) in the Amazonian fish *Hoplias malabaricus*. Parasitol Res 82(3):222–224. DOI: <u>https://doi.org/10.1007/s004360050099</u>.

Barassa, B; Adriano, EA; Cordeiro, NS; Arana, S; Ceccarelli, PS. (2012). Morphology and host–parasite interaction of *Henneguya azevedoi* n. sp., parasite of gills of *Leporinus obtusidens* from Mogi-Guacu River, Brazil. Parasitol Res 110(2):887–894. DOI: https://doi.org/10.1007/s00436-011-2571-5.

Barta, JR; Martin, DS; Liberator, PA; Dashkevicz, M; Anderson, JW; Feighner, SD; ... & Profous-Juchelka, H. (1997). Phylogenetic relationships among eight Eimeria species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. The Journal of parasitology, 262-271. DOI: https://doi.org/10.2307/3284453.

Biosecurity, NZ. (2005). Import Risk Analysis: Ornamental Fish. Ministry of Agriculture and Forestry, New

Zealand.

Capodifoglio, KRH; Adriano, EA; Milanin, T; Silva, MRM; Maia, AAM. (2016). Morphological, ultrastructural and phylogenetic analyses of *Myxobolus hilarii* n. sp (Myxozoa, Myxosporea), a renal parasite of farmed *Brycon hilarii* in Brazil. Parasitol Int 65(3):184–190. DOI: <u>https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.12.006.</u>

Capodifoglio, KRH; Adriano, EA; Silva, MRM; Maia AAM. (2015). Supplementary data of *Henneguya leporinicola* (Myxozoa, Myxosporea) a parasite of *Leporinus macrocephalus* from fish farms in the state of Sao[~] Paulo, Brazil, Acta Parasitol. 60 451–458.DOI: <u>https://doi.org/10.1515/ap-2015-0062.</u>

Carriero, MM; Adriano, EA; Silva, MRM; Ceccarelli, PS; Maia, AAM. (2013). Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. PLoS One 8(9): e73713.DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073713.

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. DOI: <u>https://doi.org/10.1017/S0031182003002944</u>.

Cordeiro, NS; Artigas, PT; Gióia, I; & Lima, RS. (1983). *Henneguya pisciforme* n. sp., mixosporídeo parasito de brânquias do lambari *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Characidae). *Mem. Inst. Butantan*, 47(48), 61-69.

Current, WL; Janovy, JJr. (1976). Ultrastructure of interlamellar *Henneguya exilis* in the channel catfish. J Parasitol 62(6):975–981. DOI: <u>https://doi.org/10.2307/3279193</u>.

Edgar, R.C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113 (2004). DOI: <u>https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113</u>.

Eiras, J. (2002). Synopsis of the species of the genus Henneguya Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). Syst Parasitol 52(1): 43–54. <u>https://doi.org/10.1023/A:1015016312195</u>.

Eiras, J; Adriano, EA. (2012). A checklist of new species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2002 and 2012. Syst Parasitol 83(2):95–104. https://doi. org/10.1007/s11230-012-9374-7.

Eiras, JC; Adriano, EA. A checklist of new species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2002 and 2012. *Syst Parasitol* **83**, 95–104 (2012). https://doi.org/10.1007/s11230-012-9374-7.

Eiras, JC; Malta, JC; Varela, A; Pavanelli, GC. (2004). *Henneguya schizodon* n. Sp. (Myxozoa, Myxobolidae), a parasite of the Amazonian teleost fish *Schizodon fasciatus* (Characiformes, Anostomidae). Parasite 11(2):169–173. DOI: <u>10.1051/parasite/2004112169</u>.

El-Mansy, A; Bashtar, AR. (2002). Histopathological and ultrastructural studies of *Henneguya suprabranchiae* Landsberg, 1987 (Myxosporea: Myxobolidae) parasitizing the suprabranchial organ of the freshwater catfish

Clarias gariepinus Burchell, 1822 in Egypt. Parasitol Res 88(7):617–626. DOI: <u>https://doi.org/10.1007/s00436-002-0598-3</u>.

Feijó, MM; Arana, S; Ceccarelli, PS; Adriano, EA. (2008). Light and scanning electron microscopy of *Henneguya arapaima* n. Sp. (Myxozoa: Myxobolidae) and histology of infected sites in pirarucu (Arapaima gigas: Pisces: Arapaimidae) from the Araguaia River, Brazil. Vet Parasitol 157(1–2):59–64. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.009.

Feist, SW, (2008) Myxozoan diseases. In: Eiras JC, Segner H, Wahli T, Kapoor BG (eds) fish diseases. Science publishers, Enfield, pp 613–682. DOI: <u>https://doi.org/10.1093/icb/icy039</u>.

Feist, SW. & Longshaw, M. (2008) Histopathology of fish parasite infections – importance for populations. Fish Biology.73, 2143-2160. DOI: <u>https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02060.x.</u>

Feist, SW. & Longshaw, M. (2006) Phylum Myxozoa. In: Woo PTK (ed) Fish diseases and disorders: protozoan and metazoan infections, 2nd edn. CAB International, Oxfordshire, pp 230–296. <u>https://doi.org/10.1079/9780851990156.0230</u>.

Ferreira, RLS; Silva, DT; Araújo, PG; Hamoy, I; Matos, E; Videira, MN. (2020). *Henneguya sacacaensis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) parasitizing gills of the acará bicudo *Satanoperca jurupari* (Osteichthyes: Cichlidae) in eastern Amazon. *Braz J Vet Parasitol* 2020; 29(2): e000620. DOI: <u>https://doi.org/10.1590/S1984-29612020030.</u>

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

Hallett, SL; Diamant, A. (2001). Ultrastructure and smallsubunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya lesteri* n. sp. (Myxosporea), a parasite of sand whiting *Sillago analis* (Sillaginidae) from the coast of Queensland, Australia, Dis. Aquat. Org. 46. 197–212, DOI: https://doi.org/10.3354/dao046197.

Hallett, SL; Hartigan, A. & Atkinson, SD. (2015). Myxozoans on the move: dispersal modes, exotic species and emerging diseases. In *Myxozoan evolution, ecology and development* (pp. 343-362). Springer, Cham.

Junk, Wolfgang J; Soares, MGM; Bayley, PB. (2007). Freshwater fishes of the Amazon River basin: their biodiversity, fisheries, and habitats. *Aquatic Ecosystem Health & Management*. 10 (2): 153–173. DOI: <u>https://doi.org/10.1080/14634980701351023</u>.

Kabsch, W. & Vandekerckhove, J. (1992). Structure and function of actin. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 21(1), 49-76. DOI: 0.1146/annurev.bb.21.060192.000405.

Kearse, M; Moir, R; Wilson, A; Stones-Havas, S; Cheung, M; Sturrock, S; Buxton, S; Cooper, A; Markowitz, S; Duran, C; Thierer, T; Ashton, B; Mentjies, P; Drummond, A. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software plat- form for the organization and analysis of sequence data, Bioinformatics 28. 1647–1649. DOI: <u>https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199</u>.

Kent, ML; Andree, KB; Bartholomew, JL; El-Matbouli, M; Desser, SS; Devlin, RH; Feist, SW; Hedrick, RP; Hoffmann, RW. Khattra J; Hallett, SL; Lester, RJ; Longshaw, M; Palenzeula, O; Siddall, ME; Xiao, C. (2001) Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. J Eukaryot Microbiol 48(4):395–413. <u>https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00173.x</u>.

Livengood, EJ. & Chapman, FA. (2020). The Ornamental fish trade: an introduction with perspectives for responsible aquarium fish ownership. IFAS Extension í Florida University, 124(1): 1-7.

Mathews, PD; Maia, AA. & Adriano, EA. (2016). *Henneguya melini* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae), a parasite of *Corydoras melini* (Teleostei: Siluriformes) in the Amazon region: morphological and ultrastructural aspects. *Parasitol Res* 115, 3599–3604. DOI: <u>https://doi.org/10.1007/s00436-016-5125-z</u>.

Mathews, PD; Mertins, O; Pereira, JOL; Maia, AAM; Adriano, EA. (2018). Morphology and 18S rDNA sequencing of *Henneguya peruviensis* n. sp. (Cnidaria: Myxosporea), a parasite of the Amazonian ornamental fish *Hyphessobrycon loretoensis* from Peru: A myxosporean dispersal approach. ACTA TROPICA, v. 187, p. 207-213.

Matos, E; Tajdar, i J; Azevedo, C. (2005). Ultrastructural studies of *Henneguya rhamdia* n. Sp. (Myxozoa) a parasite from the Amazon teleost fish, Rhamdia quelen (Pimelodidae). J Eukaryot Microbiol 52(6):532–537. DOI: <u>https://doi.org/10.1111/j.1550408.2005.00063.x.</u>

Miller, MA; Pfeiffer, W; Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees", in: Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans, LA, pp. 1–8. DOI: <u>https://doi.org/10.1186/gb-2001-3-1-reviews3001</u>.

Molnár, K; Eszterbauer, E; Szekely, C; Dan, A; Harrach, B. (2002). Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. J Fish Dis 25(11):643–652. DOI: <u>https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00409.x.</u>

Molnár, K; Marton, S; Eszterbauer, E; & Székely, C. (2006). Comparative morphological and molecular studies on *Myxobolus* spp. infecting chub from the River Danube, Hungary, and description of M. muellericus sp. n. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73(1), 49-61.

Moreau, MA. & Coomes, OT. (2006). Potential threat of the international aquarium fish trade to silver arawana Osteoglossum bicirrhosum in the Peruvian Amazon. *Oryx*, *40*(2), 152-160.

Moreira, GS; Adriano, EA; Silva, MR; Ceccarelli, PS. & Maia, AA. (2014). Morphology and 18S rDNA sequencing identifies *Henneguya visibilis* n. sp., a parasite of *Leporinus obtusidens* from Mogi Guaçu River, Brazil. *Parasitology research*, *113*(1), 81-90. DOI: <u>https://doi.org/10.1007/s00436-013-3629-3</u>.

Müller, MI; Naldoni, J; Corrêa, LL. & Adriano, EA. (2022). Two novel species of *Myxobolus* parasitizing the gills of *Semaprochilodus insignis* in the Brazilian Amazon. *Microbial Pathogenesis*, *165*, 105464. DOI: https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105464.

Naldoni, J; Arana, S; Maia, AA; Silva, MR; Carriero, MM; Ceccarelli, PS; Tavares, LE; Adriano, EA. (2011). Host–parasite–environment relationship, morphology and molecular analyses of *Henneguya eirasi* n. sp. parasite of two wild *Pseudoplatystoma* spp. in Pantanal Wetland, Brazil. Vet Parasitol 177(3–4):247–255. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.008.

Naldoni, J; Arana, S; Maia, AAM; Ceccarelli, PS; Tavares, LER; Borges, FA; Pozo, CF; Adriano, EA. (2009). *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a South American catfish: histopathology and ultrastructure. Vet Parasitol 166:52–59. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.034.

Naldoni, J; Maia, A.A; da Silva, MR. & Adriano, EA. (2014). *Henneguya cuniculator* sp. nov., a parasite of spotted sorubim *Pseudoplatystoma corruscans* in the São Francisco Basin, Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms*, *107*(3), 211-221.

Okamura, B; Hartigan, A. & Naldoni, J. (2018). Extensive uncharted biodiversity: the parasite dimension. Integrative and Comparative Biology, 6, 1132–114515.

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

Rambaut, A. (2009). Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology: Fig-Tree, Available at, <u>http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/</u>. (Accessed Jul 2022).

Rocha, E; Matos, E. & Azevedo, C, (1992). *Henneguya amazonica* n.sp. (Myxozoa, Myxobolidae), parasitizing the gills of *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 (Teleostei, Cichlidae) from Amazon river. Eur J Protistol 28(3):273–278. DOI: <u>https://doi.org/10.1016/S0932-4739(11)80233-6</u>.

Rocha, S; Casal, G; Garcia, P; Matos, E; Al-Quraishy, S; Azevedo, C. (2014). Ultrastructure and phylogeny of the parasite *Henneguya carolina* sp. nov. (Myxozoa), from the marine fish *Trachinotus carolinus* in Brazil. Dis Aquat Org 112(2):139–148. DOI: <u>https://doi.org/10.3354/dao02794</u>.

Santos, GMD; Ferreira, EJG & Zuanon, JAS. (2009). Peixes comerciais de Manaus. editora INPA.

Sitjá-Bobadilla, A. (2008). Fish immune response to myxozoan parasites. Parasite, v. 15, p. 420-425. DOI: https://doi.org/10.1051/parasite/2008153420.

Steindachner, F. (1875). Beiträge der Kenntniss der Chromiden des Amazonenstromes. Sitzungsberichte der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften, Mathematisch-naturwissenschaftliche Classe, 71: 61-137.

Velasco, M; Videira, M; Nascimento, LCS; Matos, P; Gonçalves, EC; Matos, E. (2016). *Henneguya paraensis* n. sp. (Myxozoa; Myxosporea), a new gill parasite of the Amazonian fish *Cichla temensis* (Teleostei: Cichlidae): morphological and molecular aspects. Parasitol Res 115(5):177–91787. DOI: <u>https://doi.org/10.1007/s00436-016-4916-6.</u>

Videira, M; Velasco, M; Azevedo, R; Silva, R; Gonçalves; Matos, P; Matos, E. (2015). Morphological aspects of *Henneguya aequidens* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) in *Aequidens plagiozonatus* Kullander, 1984 (Teleostei: Cichlidae) in the Amazon region, Brazil. Parasitol Res 114(3):1159–1162. DOI: <u>https://doi.org/10.1007/s00436-014-4295-9</u>.

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 Org 53(1):55–60. DOI: 10.3354/dao053055.

Xia, X. (2013) DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution, Mol. Biol. Evol. 30. 1720–1728. DOI: <u>https://doi.org/10.1093/molbev/mst064</u>.

Zatti, SA; Atkinson, SD; Maia, AAM; Bartholomew, J; Adriano E.A. (2018). Novel *Henneguya* spp. (Cnidaria: Myxozoa) from cichlid fish in the Amazon basin cluster by geographic origin. *Parasitol Res* 117, 849–859 DOI: https://doi.org/10.1007/s00436-018-5762-5.

6. CAPÍTULO 2: Mixozoários celozóicos da familia Ceratomyxidae parasitando de peixes ciclídeos de amazônicos de interesse em aquarismo

Resumo

Embora em todo o mundo a maioria das espécies de Myxozoa dos gêneros Ceratomyxa e Ellipsomyxa foram descritas em hospedeiros marinhos, uma crescente diversidade de espécies destes gêneros tem sido relatada em peixes de água doce da América do Sul, principalmente em águas amazônicas. O presente estudo trata de duas espécies de Myxozoa, uma do gênero Ceratomyxa e outra do gênero Ellipsomyxa, respectivamente parasitando a vesícula biliar dos ciclídeos Geophagus altifrons e Satanoperca jurupari da bacia Amazônica. Análises morfológicas (microscopia de luz e eletrônica de transmissão), moleculares (sequenciamento de pequenas subunidades do DNA ribossômico – SSU-rDNA) e filogenéticas foram utilizadas para o estudo das espécies. Ceratomyxa sp. 1 foi encontrada em 64,2% dos 14 espécimes de G. altifrons examinados, com plasmódios apresentando forma e motilidade vermiformes. Ellipsomyxa sp. 1 foi encontrado em 33,3% dos 6 espécimes de S. jurupari, quando observou-se pseudoplasmódios dispóricos amorfos, com expansões citoplasmáticas formando pseudópodes. As análises ultra estruturais revelaram em Ceratomyxa sp. 1 plasmódios vermiformes compostos por uma região citoplasmática externa, contendo organelas e diferentes estágios de desenvolvimento esporogônico e um grande vacúolo ocupando a área interna. Em Ellipsomyxa sp. 1 foram observadas expansões citoplasmáticas nos pseudoplasmódios originando pseudópodes. As análises de distância genética revelaram ínfima diferença entre Ceratomyxa sp. 1 e Ceratomyxa amazonensis, mostrando assim, tratar-se da mesma espécie, sendo revelado neste estudo a ocorrência da espécie em um novo hospedeiro. Para Ellipsomyxa sp. 1, os dados moleculares revelaram diferença de 1,6% para Ellipsomyxa amazonensis e Ellipsomyxa paraensis, e associados com os dados morfológicos foi possível identificá-la como um novo táxon dentro do gênero Ellipsomyxa. A análise filogenética revelou o agrupamento de Ellipsomyxa sp. 1 juntamente com as demais espécies de *Ellipsomyxa* de água doce da região amazônica.

6.1. Introdução

A Classe Myxozoa Grassé, 1970 (mixozoários) comporta espécies de cnidários endoparasitos que durante o processo de divergência tornaram-se miniaturizadas, morfologicamente simplificados e desenvolveram um ciclo de vida parasitário complexo (Okamura et al., 2015). As cerca de 2600 espécies descritas estão distribuídas em dois grupos atualmente considerados como subclasses: Subclasse Malacosporea Canning, Curry, Feist, Longshaw & Okamura, 2000 (malacosporídeos), que divergiu precocemente e conta com menos de uma dezena de espécies descritas até o momento, e os ciclos biológicos ocorrem entre hospedeiros vertebrados peixes e invertebrados briozoários; a Subclasse Myxosporea Bütschli, 1881 (mixosporídeos), que é um grupo derivado com ampla radiação, cujos ciclos biológicos envolvem vertebrados, principalmente peixes, mas também anfíbios e répteis, e raramente aves e mamíferos e anelídeos (Lom & Dyková, 2006; Okamura et al., 2018; Okamura et al., 2015).

O gênero Ceratomyxa Thélohan, 1892, família Ceratomyxidae, é um dos 61 gêneros da Subclasse Myxosporea e suas espécies têm sido relatadas primariamente na vesícula biliar de peixes marinhos, com apenas 11 espécies recentemente descobertas infectando hospedeiros de água doce, principalmente na América do Sul (Eiras, 2006; Eiras et al, 2018; Azevedo et al, 2011; Azevedo et al., 2013; Mathews, et al., 2016; Adriano & Okamura, 2017; Zatti et al., 2017; Zatti et al., 2018a; Silva et al., 2020; Bittencourt et al., 2021; Zatti et al., 2022; Araújo et al., 2022 e Franzolin et al., 2022). Dessas espécies, Ceratomyxa vermiformis Adriano & Okamura, 2017, Ceratomyxa brasiliensis Zatti, Atkinson, Bartholomew, Maia & Adriano, 2017, Ceratomyxa gracillima Zatti, Atkinson, Bartholomew, Maia & Adriano 2017, Ceratomyxa fonsecai Silva, Carvalho, Hamoy & Matos, 2020, Ceratomyxa macapaensis Bittencourt, Silva, Hamoy, Carvalho, Silva, Videira, Carvalho & Matos 2021, Ceratomyxa cf. fonsecai Zatti, Adriano, Araújo, Franzolin & Maia, 2021, Ceratomyxa mandii Araújo, Adriano, Franzolin, Zatti & Naldoni, 2022 e Ceratomyxa barbata Franzolin, Araújo, Zatti, Naldoni & Adriano 2022, apresentam plasmódios móveis e em formato vermiformes, características que contrastam com os padrões gerais das espécies de Ceratomyxa de ambiente marinho (Adriano et al., 2021).

O gênero *Ellipsomyxa* Køie, 2003, também agrupado na família Ceratomyxidae, comporta 16 espécies que são parasitas de vesícula biliar de peixes de águas marinhas,

salobras e estuarinas, mas seguindo o mesmo padrão de *Ceratomyxa* spp., algumas espécies têm sido recentemente descritas infectando peixes de água doce na Bacia Amazônica (Zatti et al., 2018b; 2020; Silva et al., 2018; Ferreira et al., 2021).

Neste estudo, foram utilizados dados morfológicos, ultra estruturais e de sequenciamento da menor subunidade do DNA ribossomal SSU-rDNA, para estudar uma espécie do gênero *Ceratomyxa* parasita de *Geophagus altifrons* Heckel, 1840 e outra do gênero *Ellipsomyxa* parasita de *Satanoperca jurupari* Heckel, 1840, ambas infectando a vesícula biliar dos respectivos hospedeiros. *Geophagus altifrons* e *S. jurupari* são espécies que pertencem à família Cichlidae e são comumente encontrados em águas da bacia amazônica, sendo conhecidas na região respectivamente como acaratinga e demônio comedor de terra, e são espécies importantes no comércio de peixes ornamentais (Silvano et al., 2020; Ferreira, et al., 2021; Froese & Pauly 2022). Em geral, ciclídeos possuem grande importância econômica no mercado global de aquarismo, movimentando milhares de exemplares em todo o mundo, e assim, podendo ser um importante meio de disseminação e introdução de parasitas (Nelson et al., 2016; Hallett et al., 2015).

6.2 Material e métodos

Em outubro de 2021, janeiro e agosto de 2022 foram capturados quatorze exemplares de *G. altifrons* e seis de *S. jurupari* nos rios Amazonas e Tapajós, no município de Santarém, Pará, Brasil (2°23'49.79''S 54°43'53.33W). Os peixes foram capturados com rede de espera e transportados vivos para laboratório de campo. A captura foi autorizada pelo Ministério do Meio Ambiente do Brasil (SISBIO n°67616-2) e eutanasiados conforme autorização do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo (CEUA n°6549290920). No Laboratório de campo todos os órgãos foram analisados utilizando-se estéreo microscópio Zeiss Stemi 2000 e microscópio Zeiss Primo Star, e os mixosporídeos encontrados foram fixados em glutaraldeído 2,5% para análise morfológica e ultra estrutural, e em etanol 100% para sequenciamento de DNA.

No Laboratório de Genética Evolutiva da UNIFESP - Campus Diadema, o material fixado em glutaraldeído 2,5% foi observado sob contraste de interferência diferencial (DIC), em um microscópio de luz Carl Zeiss Axio Imager A2 equipado com um Axiocam. As medidas foram feitas em 30 mixosporos maduros usando o software AxioVision 4.8, seguindo os critérios apontados na literatura (Lom & Arthur, 1989;

Gunter et al.,2009; Whipps et al., 2013; Heiniger e Adlard, 2014; Thabet et al., 2016; Zatti et al., 2018).

Para análises ultra estruturais, amostras fixadas em glutaraldeído 2,5% foram lavadas e pós fixadas em OsO4 2% por 2 h. Em seguida foram desidratadas em soluções crescentes de etanol + óxido propilênico e então embebidas em resina EMbed 812 (EMS, Hatfield, PA). Após a polimerização da resina, foram obtidos cortes semifinos (~2µm), os quais foram corados com azul de toluidina e analisados em microscopia de luz para avaliar a qualidade das amostras. Por fim, procedeu-se a confecção dos cortes ultrafinos, que foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e em seguida os exames foram realizados no microscópio eletrônico Morgagni 268D, do Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem (CADI), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – USP.

As análises moleculares foram realizadas a partir da bile contendo os parasitas, preservadas em etanol 100%. A extração do DNA foi realizada com o kit DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Na amplificação da SSUrDNA, as reações em cadeia da polimerase-PCR foram realizadas utilizando os mesmos primers e condições descritas por Adriano et al. (2021) e Zatti et al. (2020). A quantificação dos produtos de PCR foi realizada com a aplicação de 5 µl em gel de agarose a 1,5%, diluído em tampão TBE (0,045 M Tris-borato, 0,001 M EDTA pH 8,0), corado com Sybr Safe DNA gel (Thermo Scientific-Carlsbad, Califórnia, EUA) e analisado em um transiluminador MiniBis Pro. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados por comparação com o 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific-Carlsbad, Califórnia, EUA). Os amplicons foram então purificados usando o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) e sequenciados diretamente usando os mesmos primers do PCR (3,2 pmol) e o kit BigDye v.3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, CA, EUA), no sequenciador Applied Biosystems ABI 3730 do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho (LaCTAD), da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

Os dados das sequências foram montados e editados com o pacote de *software BioEdit* versão 7.0.9.0 e quaisquer bases ambíguas foram esclarecidas com referência visual aos cromatogramas ABI correspondentes, e ambas as extremidades imprecisas foram aparadas. Buscas BLAST, no banco de dados da plataforma do *Nacional Center* *for Biotechnology Information* – NCBI, foram realizadas visando confirmar os resultados das sequências obtidas por cada *primer*, bem como dos *contigs* das sequências finais resultantes de cada espécie estudada. As distâncias genéticas foram determinadas usando a matriz do modelo de distância *p* no MEGA 11 (Tamura et al., 2021).

6.3 Resultados

Geophagus altifrons e *S. jurupari* exibiram plasmódios livres na bile, os quais respectivamente apresentaram características gerais dos gêneros *Ceratomyxa* e *Ellipsomyxa* (Fig 1C e 2D). Em *G. altifrons* a prevalência foi de 64,2% (9/14) enquanto para *S. jurupari* foi de 33,3% (2/6).

Nos exemplares de *G. altifrons*, os plasmódios de *Ceratomyxa* sp. 1 apresentaram forma e motilidade vermiformes, tendo as extremidades ligeiramente afiladas, com comprimento médio de 106,9 ± 52,1 (67,3-202,6) µm e largura média de 7,6 ± 1,7 (4,9-11,1) µm (N=10). Os mixosporos maduros exibiram valvas lisas, de igual tamanhos, levemente curvadas, e com extremidades arredondadas, medindo 4,9 ± 1,4 (3,1 – 6,3) µm de comprimento, 23,9 ± 5,9 (18,8-40,6) µm de espessura e ângulo posterior de 147,8° ± 37,8° (174,9° – 29,9°). Cápsulas polares subesféricas, com tamanhos iguais e medindo 2,4 ± 0,8 (1,2-5,6) µm de comprimento e 1,9 ± 0,3 (1,5 – 2,8) de largura, situadas uma em cada lado da linha sutural. Túbulos polares com 3-4 voltas (Tab. 1. Fig. 1).

Espécie	Esp	oro	Cápsulas	Polares	Ângulo postorior	N° Voltas	Hospedeiro
Referência	Espessura	Largura	Comprimento	Largura	Aliguio posterior	Túbulos polares	Localização
Ceratomyxa sp. 1	23,9 ± 5,9	$4,9 \pm 1,4$	$2,4 \pm 0,8$	1,9 ± 0,3 (1,5	147,8° ± 37,8°	3-4	Geophagus altifrons
Presente estudo	(18,8-40,6)	(3,1-6,3)	(1,2-5,6)	- 2,8)	(174,9° – 29,9°)		Rio Tapajós, PA
Ceratomyxa brasiliensis	$41,2 \pm 2,9$	$6,3 \pm 0,6$	$2,6 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,4$	147°	3–4	Cichla monoculus
Zatti et al., 2017	(37,1–47,6)	(5,1–7,5)	(2–3,3)	(1,8–3,7)			Rio Tapajós, PA
Ceratomyxa amazonensis	$15,8 \pm 0,4$	$7,0\pm 0,3~(6,2-$	3,2 ± 0,3 (2,4–	$2,6 \pm 0,2$	$105^{\circ} - 115^{\circ}$	3–4	Symphysodon discus
Mathews et al., 2016	(15,0–16,7)	7.6)	3.6)	(2,4–2,9)			Rio Negro, AM
Ceratomyxa amazonensis	$24,2 \pm 0,4$	$4,72 \pm 0,1$	$2,31 \pm 0,1$	$2,15 \pm 0,1$	154° (153°–156°)	3-4	Symphysodon discus
Sousa et al., 2021	(23,9–25,3)	(4,52–4,81)	(2,29–2,33)	(2,13–2,17)			Rio Unini, AM
Ceratomyxa macapaensis n. sp.	22,7±0,3	$4,2\pm0,5$	1,86±0.3	$1,63\pm0,1$	-	3–4	Mesonauta festivus
Bittencourt et al., 2022							Rio Piririm, AP
Ceratomyxa mylei	-	-	$2.1 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,3$	-	5–6	Myleus rubripinnis
Azevedo et al., 2011*							Lago Sapurua, AM
Ceratomyxa mandii	31,2 (26,2–36,3)	4,6 (3,4–5,5)	1,8 (1,0-2,5)	1,9 (1,2–2,4)	162° (143–178)	3-4	Pimelodina flavipinnis
Araújo et. al., 2022							Rio Solimões, AM
Ceratomyxa fonsecai	28.9 (2.7)	2.6 (0,1)	1,9 (0,3)	1,7 (0,2)	164,8° (8,6°)	3–4	Hemiodus unimaculatus
Silva et al., 2020							Rio Tocantins, MA
Ceratomyxa cf. fonsecai	$28 \pm 1,7$ (24,7–	$3,3 \pm 0,2 (2,9-$	$1,6 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,3$	$166^{\circ} \pm 7,43^{\circ}$	-	Hemiodus orthonops
Zatti et al., 2021	31,7)	3,9)	(1,11–2,3)	(0, 9-2, 1)			Rio Paraná, PR
Ceratomyxa microlepis	$35,5 \pm 0,9$	$5,2 \pm 0,4$	$2,2 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,3$	58°-60°(?)	5–6	Hemiodus microlepis
Azevedo et al., 2013							Rio Trombetas, PA
Ceratomyxa gracillima	$7,0 \pm 0,5$ (6,0–	4,4 ± 0,4 (3,3–	$1,9 \pm 0,3 \ (1,5-$	$1,9 \pm 0,3$	$36,6^{\circ} \pm 2,9^{\circ}(35^{\circ} -$	2–3	Brachyplatystoma rousseauxii
Zatti et al., 2017	8,2)	5,7	2,5)	(1, 5-2, 5)	40°)		Rio Tapajós, PA
Ceratomyxa vermiformis	$8,4 \pm 0,4$ (7,9–	$4,5 \pm 0,2 (4,2-$	$2,7 \pm 0,1 \ (2,5-$	$2,7 \pm 0,1$	30,2° ± 6,6° (22°–	3–4	Colossoma macropomum
Adriano & Okamura, 2017	9,3)	4,8)	2,9)	(2,5–2,9)	43°)		Rio Tapajós, PA

Tabela 1. Comparação morfológica das dimensões dos mixosporos de todas as espécies de *Ceratomyxa* de água doce da América do Sul. As dimensões são dadas em micrômetros e expressas como média seguida pelo intervalo entre parênteses.

*Originalmente descrita no gênero Meglitschia.



Figura 1. Fotomicrográficas de *Ceratomyxa* sp. 1 parasito da vesícula biliar de *Geophagus altifrons. A:* Plasmódio vermiforme (seta) com múltiplos mixosporos maduros (*). Barra= 20 μ m; **B:** Ampliação de A -Mixosporos maduros (*) no interior de plasmódios (seta) Barra = 10 μ m; **C:** Esporo maduro evidenciando capsulas polares (CP) e linha sutural (seta). Barra = 20 μ m.

Nos exemplares de *S. jurupari*, os pseudoplasmódios de *Ellipsomyxa* sp. 1 foram dispóricos, amorfos, com expansões citoplasmáticas que originaram formações similares a pseudópodes (Fig.2). Mixosporos maduros com formato elipsoidal, com valvas lisas, alongadas na direção perpendicular ao plano da linha de sutura e medindo $12,0 \pm 3,2$ (10,7 – 13,7) µm de comprimento e 7,6 ± 1,5 (5,6 – 8,2) µm de largura. Linha de sutura transversal, curvada em forma de "S". Capsulas polares esféricas de tamanhos iguais, localizadas nas extremidades opostas dos mixosporos e medindo $2,8 \pm 0,4$ (2,0 - 3,6) µm diâmetro. Túbulo polar com 4-5 espirais dispostos perpendicularmente ao eixo longitudinal de cada cápsula (Tab. 2).

As análises em microscópio eletrônico de transmissão revelaram que os plasmódios vermiformes de *Ceratomyxa* sp. 1 foram organizados da seguinte forma: uma região citoplasmática externa, a qual encerra organelas e diferentes estágios de desenvolvimento esporogônico, e um grande vacúolo ocupando a área interna (Fig. 3). Em *Ellipsomyxa* sp. 1 foram observadas expansões citoplasmáticas nos pseudoplasmódios, formado estruturas similares a pseudópodos (Fig. 4).



Figura 2. Fotomicrografias de *Ellipsomyxa* sp. 1 parasito da vesícula biliar de *Satanoperca jurupari*. **A:** Dois pseudoplasmódios. Um contendo dois mixoporos maduros (mm) com capsulas polares e seus túbulos (seta preta) e outro contendo mixosporos imaturos (mi). Barra = $10 \mu m$; **B:** Pseudoplasmódio imaturo (*) mostrando expansões citoplasmáticas estilo pseudópodos (setas pretas finas). Barra = $10 \mu m$; **C:** Dois mixosporos maduros (mm) em um deles nota-se a linha de sultura (seta). Barra = $5 \mu m$; **D:** Mixosporo maduro e detalhes dos túbulos polares (seta preta). Barra = $10 \mu m$.

Tabela 2. Comparação das dimensões dos mixosporos de todas as espécies *Ellipsomyxa* descritas em água doce. As dimensões são dadas em micrômetros e expressas como a média e/ou intervalo entre parênteses.

Espécies	Espoi	: 0	Cápsula	s Polares	Nº Voltas		
Referência	Comprimento	Largura	Comprimento Largura		Túbulos polares	Hospedeiro Localização	
<i>Ellipsomyxa</i> sp. 1 Presente estudo	12,0 (10,7-13,7)	7,6 (5,6-8,2)	2,8 (2,0-3,6)	2,8 (2,1-3,7)	4-5	<i>Satanoperca jurupari</i> Rio Tapajós, PA	
Ellipsomyxa amazonensis (Zatti et al., 2018)	12,8 (12,3–13,6)	7,6 (6,7–8,7)	3,8 (3,8–4,0)	3,1 (2,5–3,4)	2–3	Brachyplatystoma rousseauxii Rio Tapajós, PA	
Ellipsomyxa tucujuensis (Silva et al., 2021)	$10,11 \pm 0,86$	7,81 ± 1,14	$3,12 \pm 0,53$	$2,5 \pm 0,32$	5–6	Satanoperca jurupari Rio Curiau, AP	
Ellipsomyxa paraensis (Zatti et al., 2020)	11,5 (10,5–12,4)	7,5 (6,6–8,6)	3,2 (2,1–3,9)	2,6 (2–3,3)	2–3	Cichla monoculus Rio Amazonas, PA	
Ellipsomyxa plagioscioni (Zatti et al., 2020)	11,1 (10,2–12,8)	6,6 (5,6 - 8,6)	3,8 (3,2–4,4)	2,8 (2,3–3,3)	5–6	<i>Plagioscion squamosissimus</i> Rio Tapajós, PA	
Ellipsomyxa arariensis (Silva et al., 2018)	12,6 (12,3–13,6)	7,3 (6,7–8,7)	3,5 (3,8–4,0)	2,6 (2,5–3,4)	5–6	Pigocentrus attereri Rio Arari, PA	



Figura 3. Eletromigrografia de *Ceratomyxa* sp. 1 parasita da vesícula biliar de *Geophagus altifrons*. A: Corte transversal de plasmódio mostrando membrana (seta larga vazia), citoplasma (ct) contendo mitocôndrias (setas pretas), célula secundária (cs) e seu núcleo (n), membrana do vacúolo (seta larga branca) e extensa área vacuolar (v). Barra: 1 μ m; **B:** Ampliação de (A – região pontilhada) mostrando região do citoplasma (ct) com mitocôndria (seta preta) e estágios iniciais de desenvolvimento esporogônico (eie). Barra: 0,5 μ m; **C:** Corte longitudinal de plasmódio mostrando delgada camada de citoplasma (ct), extenso vacúolo (v) e mixosporo maduro (mm). Barra: 5 μ m; D: Ampliação de região de (C) detalhando junção das valvas (setas pretas) e esporoplasma (ep) de mixosporo maduro. Barra: 1 μ m.



Figura 4. Electromicrografias de *Ellipsomyxa* sp. 1 parasitando vesícula biliar de *Satanoperca jurupari*. **A:** Pseudoplasmódio imaturo (P) mostrando expansões citoplasmáticas formando pseudópodes (setas pretas). Barra: 0,5 μ m; **B** e **C**: mixosporos imaturos (sp) com cápsula polar (pc). Note os túbulos polares ainda não interiorizados (setas brancas). Barras: B = 5 e C = 2 μ m; **D**: Cápsula polar em corte transversal com detalhes do túbulo polar (setas pretas). Barra: 0,5 μ m.

Os sequenciamentos da SSU-rDNA de *Ceratomyxa* sp. 1 e *Ellipsomyxa* sp. 1 resultaram em sequências de 1576 e 1584 nucleotídeos, respectivamente. Nas análises de distâncias genéticas considerando espécies de ambiente de água doce, para *Ceratomyxa* sp. 1, parasita de *G. altifrons*, a menor distância genética (0,2%) foi com *C. amazonenses*, enquanto a maior distância foi para *C. mandi*, com 8,3% (Tab. 3). Para *Ellipsomyxa* sp. 1 parasito de *S. jurupari*, a menor distância genética foi para *E. amazonensis* e para *Ellipsomyxa paraensis* Zatti, Maia & Adriano, 2020, com 1,6% para ambas. A maior distância foi para *Ellipsomyxa tucujuensis* Ferreira, Silva Carvalho, Bittencourt, Hamoy, Matos &Videira, 2021, com 8,8% (Tab. 4).

Na análise filogenética, observou-se que *Ellipsomyxa* sp. 1 parasito de *S. jurupari* agrupou juntamente com as demais espécies de *Ellipsomyxa* de água doce. A exceção foi *Ellipsomyxa plagioscioni* Zatti, Maia & Adriano, 2020, que agrupou com espécies marinhas/estuarinas (Fig. 5).

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1-Ceratomyxa sp. 1										
2-Ceratomyxa amazonensis KX236169	0,6									
3-Ceratomyxa amazonensis MN064752	0,2	0,1								
4-Ceratomyxa mandi MZ504285	8,3	9,0	8,7							
5-Ceratomyxa barbata MZ504286	5,5	5,5	5,9	7,0						
6-Ceratomyxa brasiliensis KU978813	2,5	2,5	3,0	8,7	5,9					
7-Ceratomyxa gracillima KY934184	7,8	8,4	8,0	4,6	7,2	7,8				
8-Ceratomyxa vermiformis KX278420	6,1	6,0	5,1	6,8	3,7	6,2	6,9			
9-Ceratomyxa macapaenses MT939250	5,3	5,4	5,5	7,0	4,7	6,1	7,9	0,7		
10-Ceratomyxa cf fonsecai MW053456	7,7	7,6	8,0	6,8	5,9	7,8	6,4	6,3	6,5	-

Tabela 3. Matriz de dissimilaridade de sequências de SSU-rDNA de espécies selecionadas de *Ceratomyxa* de água doce. O triângulo mostra % de distâncias de identidade em pares.

Tabela 4. Matriz de dissimilaridade de sequências de SSU-rDNA de espécies selecionadas de *Ellipsomyxa* de água doce ajustadas para dados ausentes. O triângulo mostra % de distâncias de identidade em pares.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7
1-Ellipsomyxa sp. 1							
2-Ellipsomyxa amazonensis MF193889	1,6						
3-Ellipsomyxa plagioscioni MT039013	6,3	6,5					
4-Ellipsomyxa paraenses MH364399	1,6	0,3	5,2				
5-Ellipsomyxa arariensis MH30806	2,5	2,7	7,4	2,5			
6-Ellipsomyxa arariensis MH183026	1,9	2,9	6,8	1,9	0,5		
7-Ellipsomyxa tucujuensis MN999871	8,8	9,2	12,6	7,4	10,5	11,5	-



Figura 5. Árvore filogenética consenso de Máxima Verossimilhança (ML) obtidas a partir das sequências de SSU-rDNA de *Ceretomyxa* sp. 1 e *Ellipsomyxa* sp. 1, respectivamente parasitos de *Geophagus altifrons e Satanoperca jurupari*. Os números de acesso ao *GenBank* são apresentados na frente do nome de cada espécie.

0.050

6.4 Discussão

Como relatado acima, é ainda incipiente o conhecimento da diversidade e radiação de mixozoários dos gêneros *Ceratomyxa* e *Ellipsomyxa* em ambiente de água doce, e a diversidade conhecida neste tipo de ambiente se restringe basicamente ao continente sul-americano, a partir de estudos realizados neste século. Assim, todo o trabalho de comparação taxonômica, morfológica e molecular deste estudo foi desenvolvido com base nas espécies dulçaquícolas do continente.

No que diz respeito à espécie *Ceratomyxa* sp. 1, encontrada parasitando *G. altifrons* do Rio Tapajós, os dados moleculares demonstraram distância genética de somente 0,2 a 0,6% para *C. amazonenses*, um parasito registrado em espécimes de *Symphysodon discus* Heckel, 1840 oriundos do Rio Negro, no Estado do Amazonas. *Symphysodon discus*, assim como *G. altifrons*, pertence à família Cichlidae. Apesar da ínfima distância genética, os dados morfológicos de *Ceratomyxa* sp. 1 diferem daqueles obtidos na descrição original de *C. amazonensis*, sendo os mixosporos de *Ceratomyxa* sp. 1 mais curtos, mais espessos e levemente curvados, enquanto *C. amazonensis* são fortemente arqueados (ver Tab.1 e Fig. 1 de Mathews et al. 2016). Por outro lado, em um segundo encontro da espécie, Sousa et al. (2021), utilizando dados morfológicos e moleculares, relataram mixosporos de *C. amazonensis* levemente curvados em infecções de exemplares de *S. discus* capturados no Rio Unini, um afluente do Rio Negro, e naqueles mixosporos, as medidas foram similares àquelas obtidas nos mixosporos de *Certatomyxa* sp. 1 encontrados em *G. altifrons* neste trabalho (Tab. 1).

Como salientado acima, as distâncias genéticas da SSU-rDNA entre *Ceratomyxa* sp. 1 parasito de *G. altifrons* e as sequências de *C. amazonensis* obtidas de *S. discus* foram de apenas 0,6% (sequência no. KX236169) e 0,2% (sequência MN064752), respectivamente obtidas por Mathews et al. (2016) e Sousa et al. (2021). Assim, apesar de discrepâncias morfológicas com o achado de Mathews et al. (2016), os dados deste estudo demonstram a ocorrência de *C. amazonensis* infectando um novo hospedeiro, *G. altifrons*, na bacia amazônica.

Ocorrência de uma mesma espécie em hospedeiros distintos foi também observado no caso de *Ceratomyxa tuniensis* Thabet, Mansour, Omar, & Tlig-Zouari, 2016, encontrada parasitando a vesícula biliar de *Caranax rhonchus* Geoffroy Saint-Hilaire, 1817 e *Trachurus trachurus* Linnaeus,1758 oriundos do Golfo de Gabes, na Tunísia (Thabet et al., 2016).

A despeito da similaridade dos dados do sequenciamento da SSU-rDNA observada entre as mostras de *C amazonensis* parasita de *S. discus* (Mathews et al., 2016; Sousa et al., 2021) e esse novo registro em *G. altiforns*, não podemos deixar desapercebido a diferença morfológica observada em referência aos mixosporos da descrição original de Mathews, et al. (2016). É importante destacar que a existência de plasticidade em mixospores de *Ceratomyxa* spp. tem sido previamente observada e discutida (Gunter et al., 2009). Segundo os autores, a escassez de caracteres morfológicos, plasticidade do mixosporos e variação morfológica dependente do hospedeiro, tornam difícil determinar se *Ceratomyxa* spp. em hospedeiros intimamente relacionados são da mesma espécie ou são espécies intimamente relacionadas, e destacam a importância da combinação das análises morfológicas com dados moleculares. Zhai et al. (2016) relataram que a ocorrência de variações morfométricas intraespecífica de mixosporídeos é comum, contudo, há uma clara sobreposição dentro das faixas de dimensões (mínimas e máximas). Assim, diante da existência de tão expressiva discrepância morfológica entre os mixosporos da descrição original de *C. amazonensis* (Mathews et al., 2016) e aqueles dos encontros subsequentes (Sousa et al., 2021; este estudo -Tab. 1), novas pesquisas serão necessárias para esclarecer tal dissimilaridade morfológica.

As análises ultra estruturais revelaram desenvolvimento assíncrono, com plasmódio de *Ceratomyxa* sp. 1 contendo estágios iniciais de desenvolvimento esporogônicos, mixosporos imaturos e maduros, uma característica típica em mixosporídeos. O desenvolvimento estágios de desenvolvimento esporogônico, bem como organelas citoplasmáticas estão dispostos em uma região citoplasmática externa, enquanto na porção central dos plasmódios, observa-se a presença de um grande vacúolo, e estas características são similares àquelas relatadas em outras espécies de água doce sul-americanas (Adriano & Okamura, 2017; Adriano et al., 2021; Araújo et al., 2021. Franzolin et al., 2022).

No que se refere à espécie de *Ellipsomyxa* encontrada parasitando a vesícula biliar de *S. jurupari*, observou-se que os mixosporos apresentam semelhanças dos comprimentos e larguras em relação àqueles das espécies *E. amazonensis*, *E. paraensis* e *Ellipsomyxa arariensis* Silva; Matos; Lima, Furtado, Hamoy & Matos, 2020. Porém, a espécie aqui estudada diferiu dessas três espécies pela quantidade de voltas do túbulo polares e por apresentar cápsulas polares esféricas (Tab. 2). Os dados do sequenciamento da SSU-rDNA, revelam que dentre as espécies de *Ellipsomyxa* de água doce, *E. amazonensis* e *E. paraensis* foram as espécies com menor distância genética para *Ellipsomyxa* sp. 1 de *S. jurupari* deste estudo, com 1,6% de diferença. Embora não exista uma definição da distância genética interespecífica exata para definir espécies (Gunter et al., 2009), uma análise cuidadosa mostra que o nível de diferença interespecífico no gênero *Ellipsomyxa* pode ser tão baixo quanto 0,5% entre *Ellipsomyxa gobii* Køie, 2003 e *Ellipsomyxa syngnathi* Køie & Karlsbakk, 2009, 0,3% entre *E. syngnathi* e

Ellipsomyxa mugilis (Sitja-Bobadilla & Alvarez-Pellitero, 1993), e 0,2% entre *Ellipsomyxa nigropunctatis* Heiniger & Adlard, 2014 e *Ellipsomyxa arothroni* Heiniger & Adlard, 2014 (ver tabela 2 em Zatti et al., 2020). Assim, com base nas diferenças morfológicas e moleculares, propomos que *Ellipsomyxa* sp. 1 encontrado infectando vesícula biliar de *S. jurupari* seja considerado um novo *taxon*. E esta é a segunda espécie do gênero *Ellipsomyxa* descrita infectando *S. jurupari*. Antes, foi descrito *Ellipsomyxa tucujuensis* Ferreira, Silva, de Carvalho, Bittencourt, Hamoy, Matos, & Videira, 2021, infectando essa espécie de ciclídeo, também na bacia Amazônica.

Do ponto de vista do conhecimento da diversidade e radiação desses parasitos, o gênero *Ellipsomyxa* conta, até aqui, com apenas 16 espécies conhecidas, sendo essa a sétima encontrada em peixes da região amazônica. Vale destacar que cinco espécies foram descritas em peixes de água doce amazônica, e esse é o único bioma em todo o mundo onde se registrou a ocorrência de espécies deste gênero de Myxozoa em ambiente dulçaquícola até o momento.

A análise filogenética revelou, embora com baixos valores de suporte, o agrupamento das espécies de *Ellipsomyxa* parasitos de água doce sul-americanas, com exceção de *E. plagioscioni*, que apareceu em um grupo irmão desse grupo de água doce.

Diante dos dados aqui apresentados, o presente estudo contribui para ampliar a diversidade de mixosporídeos da bacia Amazônica, além de ampliar o conhecimento da fauna parasitária de peixes economicamente importantes na indústria de aquarismo.

6.5 Referências

Adriano, EA; Okamura, B. (2017). Motility, morphology and phylogeny of the plasmodial worm, *Ceratomyxa vermiformis* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa: Myxosporea), Parasitol. 144. 158–168. DOI: https://doi.org/10.1017/S0031182016001852.

Adriano, EA; Zatti, SA. & Okamura, B. (2021). How to build single-celled cnidarians with worm-like motility: Lessons from Myxozoa. *Journal of Anatomy*, 240(3), 475-488. DOI: <u>https://doi.org/10.1111/joa.13566.</u>

Araújo, BL; Adriano, EA; Franzolin, GN; Zatti, SA; Naldoni J. (2022). A novel *Ceratomyxa* species (Myxozoa: Cnidaria) infecting an Amazonian catfish, Parasitol 89. 102582. DOI: https://doi.org/10.1016/j.parint.2022.102582.

Azevedo, C; Rocha, S; Casal, G; São Clemente, C. S; Matos, P. S; Al- Quraishy, A. Matos, E. (2013). Ultrastructural description of *Ceratomyxa microlepis* sp. nov. (Phylum Myxozoa): a parasite infecting the gall bladder of *Hemiodus microlepis*, a freshwater teleost from the Amazon River, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 108. 150–154. DOI: https://doi.org/10.1590/0074-0276108022013004.

Azevedo, C; Rocha, S; Casal, G; São Clemente, C. S; Matos, PS; Al- Quraishy, A. Matos, E. (2011). Light and ultrastructural description of *Meglitschia mylei* n. sp. (Myxozoa) from *Myleus rubripinnis* (Teleostei: Serrasalmidae) in the Amazon river System, J. Eukaryot. Microbiol. 58 525–528. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2011.00583.x.

Bittencourt, LS; Silva, DT; Hamoy, I; Carvalho, AA; Silva, MF; Videira, M; Carvalho; JCT; Matos, ER. (2021). Morphological and Phylogenetic Features of *Ceratomyxa macapaensis* n. sp. (Myxozoa: Ceratomyxidae) in *Mesonauta festivus* Heckel, 1840 (Cichliformes: Cichlidae) from the eastern Amazon region, Acta Parasitol. 67. 322–329. DOI: <u>https://doi.org/10.1007/s11686-021-00460-x</u>.

Canning, EU; Curry, A; Feist, SW; Longshaw, M; Okamura, B. (2000). A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). J. Eukaryot. Microbiol. 47, 456–468. DOI: <u>https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00075.x</u>.

Eiras, JC. (2006). Synopsis of the species of the genus *Ceratomyxa* Thelohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea: Ceratomyxidae), Syst. Parasitol. 65.49–71. DOI: <u>https://doi.org/10.1007/s11230-006-9039-5</u>.

Eiras, JC; Cruz, C; Saraiva, A. (2018). Synopsis of the species of *Ceratomyxa* Thelohan, 1892 (Cnidaria, Myxosporea, Ceratomyxidae) described between 2007 and 2017, Syst. Parasitol. 95. 427–446. DOI: https://doi.org/10.1007/s11230-018-9791-3.

Ferreira, RLS; Silva, DT; Carvalho, AA; Bittencourt, LS; Hamoy, I; Matos, E. & Videira, M. (2021). *Ellipsomyxa tucujuensis* n. sp. (Myxozoa: Ceratomyxidae), a parasite of *Satanoperca jurupari* (Osteichthyes: Cichlidae) from the Brazilian Amazon. *Parasitology International*, 83, 102332. DOI: https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102332.

Franzolin, GN; Araújo, BL; Zatti, AS; Naldoni, J. & Adriano, EA. (2022). Occurrence of the host-parasite system *Rhaphiodon vulpinus* and *Ceratomyxa barbata* n. sp. in the two largest watersheds in South America. *Parasitology International*, *91*, 102651. DOI: <u>https://doi.org/10.1016/j.parint.2022.102651</u>.

Froese, R. & Pauly, D. (2022). FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (09/2022).

Grassé, PP. (1970). Embranchement des Myxozoaires. In: P.-P. Grassé, R.A. Poisson and O. Tuzet (Eds.), Précis de Zoologie1, Invertébrés. Second Edition. Mason et Cie, Paris, p. 107–112.

Gunter, NL; Whipps, CN; Adlard, RD. (2009). *Ceratomyxa* (Myxozoa: Bivalvulida): Robust taxon or genus of convenience? Int. J. Parasitol. 39.1395–1405. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.008.

Hallett, CS. & Tweedley, JR. (2015). Assessment of the condition of the Swan-Canning Estuary in 2015, based on the Fish Community Indices of estuarine condition. Final report to the Department of Parks and Wildlife.

Heckel, J. (1840). Johann Natterer's neue Flussfische Brasilien's nach den Beobachtungen und Mittheilungen des Entdeckers beschrieben. (Erste Abtheilung, die Labroiden.) Annalen des wiener Museums der Naturgeschichte, 2: 327-470. Heiniger, H. & Adlard, RD. (2014). Relatedness of novel species of *Myxidium* Bütschli, 1882, Zschokkella Auerbach, 1910 and *Ellipsomyxa* Køie, 2003 (Myxosporea: Bivalvulida) from the gall bladders of marine fishes (Teleostei) from Australian waters. *Systematic Parasitology*, 87(1), 47-72. DOI: <u>https://doi.org/10.1007/s11230-013-9454-3</u>.

Køie, M. & Karlsbakk, E. (2009). *Ellipsomyxa syngnathi* sp. n. (Myxozoa, Myxosporea) no peixecachimbo *Syngnathus typhle* e *S. rostellatus* (Teleostei, Syngnathidae) da Dinamarca. J Parasitol Res 105(6):1611–1616. DOI: <u>https://doi.org/10.1007/s00436-009-1598-3</u>.

Koie, M. (2003). *Ellipsomyxa gobii* gen. et. sp. n. (Myxozoa: Ceratomyxidae) in the common goby Pomatoschistus microps (Teleostei: Gobiidae) from Denmark. *Folia parasitologica*, *50*(4), 269-271.

Lom, J & Arthur, J. (1989). A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea, J. Fish. Dis. 12 151–156. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1989.tb00287.x.

Lom, J & Dyková, I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology, and pathogenic species, Folia Parasitol. 53. 1–36. DOI: 10.14411/fp.2006.001.

Mathews, PD; Naldoni J; Maia, AAM; Adriano, EA. (2016). Morphology and small subunit rDNA-based phylogeny of Ceratomyxa amazonensis n. sp. parasite of Symphysodon discus, an ornamental freshwater fish from Amazon, Parasitol. Res. 115 .4021–4025. DOI: <u>https://doi.org/10.1007/s00436-016-5173-4</u>.

Nelson, JS; Grande, TC; & Wilson, MV. (2016). Fishes of the World. John Wiley & Sons.

Okamura, B; Gruhl, A; Bartholomew, JL. (2015). An introduction to myxozoan evolution, ecology and development, in: B. Okamura, A. Gruhl, J.L. Bartholomew (Eds.), Myxozoan Evolution, Ecology and Development, Springer, Switzerland, pp. 69–84. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14753-6_1.

Okamura, B; Hartigan, A. & Naldoni, J. (2018). Extensive uncharted biodiversity: the parasite dimension. Integrative and Comparative Biology, 6, 1132–114515. DOI: <u>https://doi.org/10.1093/icb/icy039.</u>

Silva, DT; Matos, PS; Lima, AM; Furtado, AP; Hamoy, I. & Matos, ER. (2018). *Ellipsomyxa arariensis* n. sp. (Myxozoa: Ceratomyxidae), a new myxozoan parasite of *Pygocentrus nattereri* Kner, 1858 (Teleostei: Characidae) and *Pimelodus ornatus* Kner, 1858 (Teleostei: Pimelodidae) from Marajó Island, in the Brazilian Amazon region. *Parasitology research*, *117*(11), 3537-3545. DOI: <u>https://doi.org/10.1007/s00436-018-6051-z</u>.

Silva, MS; Carvalho, AEFB; Hamoy, I; Matos, ER. (2020). Coelozoic parasite of the family Ceratomyxidae (Myxozoa, Bivalvulida) described from motile vermiform plasmodia found in *Hemiodus unimaculatus* Bloch, 1794, Parasitol. Res. 119 871–878. DOI: https://doi.org/10.1007/s00436-019-06505-5.

Silvano, RA; Nitschke, PP; Vieira, KC; Nagl, P; Martínez, AT., Dutra, M. C., ... & Andrade, M. C. (2020). Atlas of Fish of Tapajós and Negro Rivers III: Perciformes and Other Fish Groups. In *Fish and Fisheries in the Brazilian Amazon* (pp. 321-414). Springer, Cham.

Sitjà-Bobadilla, ARIADNA; & Alvarez-Pellitero, PILAR. (1993). Zschokkella mugilis n. sp (Myxosporea: Bivalvulida) from mullets (Teleostei: Mugilidae) of Mediterranean waters: light and electron microscopic

description. Journal of Eukaryotic Microbiology, 40(6), 755-764. DOI: <u>https://doi.org/10.1111/j.1550-</u> 7408.1993.tb04471.x.

Sousa, FB; Milanin, T; Morandini, AC; Espinoza, LL; Flores-Gonzales, A; Gomes, ALS. & Mathews Delgado, P. (2021). Molecular diagnostic based on 18S rDNA and supplemental taxonomic data of the cnidarian coelozoic *Ceratomyxa* (Cnidaria, Myxosporea) and comments on the intraspecific morphological variation. *Volume 97, Págs. 307-314*. DOI: <u>10.3897/ZSE.97.64769</u>.

Tamura, K; Stecher, G; Kumar, S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38:3022-3027. DOI: <u>https://doi.org/10.1093/molbev/msab120</u>.

Thabet, A; Mansour, L; Al Omar, SY; & Tlig-Zouari, S. (2016). *Ceratomyxa tunisiensis* n. sp. (Myxosporea: Bivalvulida) from the gallbladders of two carangid fish caught off the coast of Tunisia. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(1), 86-92. DOI: <u>https://doi.org/10.1111/jeu.12251.</u>

Whipps, CM; Adlard, RD; Bryant, MS; Lester, RJG; Findlay, Kent, V; ML. First report of three *Kudoa* species from Eastern Australia: Kudoa thyrsites from Mahi mahi (Coryphaena hippurus), Kudoa amamiensis and Kudoa minithyrsites n. sp. from Sweeper (Pempheris ypsilychnus), J. Eukaryot. Microbiol. 50.215–219. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00120.x.

Zatti, AS; Atkinson, SD; Maia, AA; Corrêa, LL; Bartholomew, JL; & Adriano, EA. (2018a). Novel *Myxobolus* and *Ellipsomyxa* species (Cnidaria: Myxozoa) parasiting *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin, Brazil. *Parasitology international*, 67(5), 612-621. DOI: https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.06.005.

Zatti, AS; Maia, AA & Adriano, EA. (2020). Growing diversity supports radiation of an *Ellipsomyxa* lineage into the Amazon freshwater: description of two novel species parasitizing fish from Tapajós and Amazon rivers. *Acta Tropica*, *211*, 105616. DOI: <u>https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.06.005</u>.

Zatti, SA; Adriano, EA; Araújo, BL; Franzolin, GN; Maia, AAM. (2022). Expanding the geographic distribution of the freshwater parasite *Ceratomyxa* (Cnidaria: Myxozoa) with vermiform-type plasmodia, Microb. Pathog. 162. DOI: <u>https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105370.</u>

Zatti, SA; Atkinson, SD; Bartholomew, JL; Maia, AAM; Adriano, E A. (2018b)A *Ceratomyxa gracillima* n. sp. (Cnidaria: Myxosporea) provides evidence of panmixia and ceratomyxid radiation in the Amazon basin, Parasitol. 145.1137–1146. DOI: <u>https://doi.org/10.1017/S0031182017002323</u>.

Zatti, SA; Atkinson, SD; Bartholomew, JL; Maia, AAM; Adriano, EA. (2017). Amazonian waters harbour an ancient freshwater Ceratomyxa lineage (Cnidaria: Myxosporea), Acta Trop. 169 100–106. DOI: <u>https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.006</u>.

Zhai, Y; Whipps, CM; Gu, Z; Guo, Q; Wu, Z; Wang, H; Liu, Y. (2016). Intraspecific morphometric variation in myxosporeans. Folia Parasitologica 63: e001. DOI: <u>https://doi.org/10.14411/fp.2016.011</u>.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo caracterizou parasitos da Subclasse Myxosporea, gêneros *Henneguya*, *Ceratomyxa* e *Ellipsomyxa* encontrados infectando três diferentes espécies de ciclídeos amazônicos. O desenvolvimento de *Henneguya* sp. 1, parasito de *Caquetaia spectabilis*, se deu em tecidos conjuntivos da córnea, nadadeiras e opérculos, onde foram observadas a formação de uma cápsula de tecido conjuntivo envolvendo os plasmódios. No olho, entretanto, observouse também um leve infiltrado inflamatório. *Ellipsomyxa* sp. 1 é o segundo registro de espécies desse gênero parasitando *Satanoperca jurupari*. Tanto *Ellipsomyxa* sp. 1 quanto *Henneguya* sp. 1 são novos táxons de mixosporídeos, enquanto *Ceratomyxa amazonensis*, parasito de *Geophagus altifrons*, é aqui registrado em uma nova espécie de hospedeiro.

Em função da crescente demanda comercial de peixes ornamentais, e do inerente potencial de disseminação de possíveis patógenos de peixes via o comércio de espécies do aquarismo, a relevância deste estudo está em disponibilizar conhecimentos sobre a diversidade de mixosporídeos que infectam um importante grupo de peixes amazônicos de interesse na aquariofilia.

8. REFERÊNCIAS

Adriano EA; Oliveira OMP, Eiras JdC (2022). Myxozoa in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. Disponível em: <<u>http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/152798</u>>. Acesso em: 26 Out. 2022.

Adriano, EA; Arana, S; Cordeiro, NS. (2005). Histology, ultrastructure and prevalence of *Henneguya piaractus* (Myxosporea) infecting the gills of *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. Diseases of Aquatic Organisms, Alemanha, v. 64, n.3, p. 229-235 DOI: 10.3354/dao064229.

Adriano, EA; Zatti, SA; Okamura, B. (2021). How to build single-celled cnidarians with worm-like motility: Lessons from Myxozoa. Journal of Anatomy. 240: 475–488. DOI: <u>https://doi.org/10.1111/joa.13566</u>.

Adriano, E.A. & Okamura, B. (2017). Motility, morphology and phylogeny of the plasmodial worm, *Ceratomyxa vermiformis* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa: Myxosporea). Parasitology, 144, 158–168. DOI: https://doi.org/10.1017/S0031182016001852.

Bartholomew, JL; Atkinson, S D; Hallett, SL; Lowenstine LJ; Garner, MM; Gardinere, CH; Rideout, BA; Keel, MK; Brown, JD. (2008). Myxozoan parasitism in waterfowl. International Journal for Parasitology, v. 38, p. 1199–1207. DOI: <u>https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.01.008</u>.

Bütschli, O. Myxosporidia. In: Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreichs. Protozoa, Second Edition. C. F. Winter, Leipzig, p. 590–603, 1882.

Chang, ES; Neuhof, M; Rubinstein, ND; Diamant, A; Philippe, H; Huchon, D. & Cartwright, P. (2015). Genomic insights into the evolutionary origin of Myxozoa within Cnidaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(48), 14912-14917. DOI: <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1511468112</u>.

Eiras, JC; Cruz, C. & Saraiva, A. (2018). Synopsis of the species of *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 (Cnidaria, Myxosporea, Ceratomyxidae) described between 2007 and 2017. *Systematic Parasitology*, 95(5), 427-446. DOI: https://doi.org/10.1007/s11230-018-9791-3.

Eiras, JC; Zhang, J. & Molnár, K (2014). Synopsis of the species of Myxobolus Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. *Systematic Parasitology*, 88(1), 11-36. DOI: https://doi.org/10.1007/s11230-004-6343-9.

Eiras, JC; Adriano, EA. (2012). Checklist of new species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2002 and 2012. Systematic Parasitology, v. 83, n. 2, p. 95–104.

Eiras, JC; Molnár, K; Lu, YS. (2005). Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxobolidae). Systematic parasitology, [s. l], v. 61, n. 1, p. 1-46, DOI: https://doi.org/10.1007/s11230-004-6343-9.

Feist, SW; Longshaw, M. (2006).Phylum Myxozoa. In Woo, P. T. K. Fish Diseases and Disorders. Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections. Second Edition. UK: CAB International, v.1, p. 230-296.

Ferreira, RLS; Silva, DT; Carvalho, AA; Bittencourt, LS; Homoy, I; Videira, M. (2021). *Ellipsomyxa tucujuensis* n. sp. (Myxozoa: Ceratomyxidae), a parasite of *Satanoperca jurupari* (Osteichthyes: Cichlidae) from the Brazilian Amazon. Parasitology International 83. 102332. DOI: <u>https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102332</u>.

Fiala, I., Bartošová-Sojková, P. & Whipps, C. M. (2015). Classification and phylogenetics of Myxozoa. In *Myxozoan evolution, ecology and development* (pp. 85-110). Springer, Cham.

Fiala, I., Hlavnicková, M., Kodádková, A., Freeman, M.A., Bartošová-Sojková, P., Atkinson, S. D (2015).
Evolutionary origin of Ceratonova shasta and phylogeny of the marine myxosporean lineage. Mol. Phylog. Evol. 86, 75–89. DOI: <u>https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.03.004</u>.

Fricke R; Eschmeyer WN; Fong JD. (eds.). Catalog of Fishes electronic version (consultado em outubro 2022) Disponível em: <<u>https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp</u>>.

Froese, R. & D. Pauly. Editors. 2022. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (09/2022).

Grassé, PP. Embranchement des Myxozoaires. In: P.-P. Grassé, R.A. Poisson and O. Tuzet (Eds.), Précis de Zoologie1, Invertébrés. Second Edition. Mason et Cie, Paris, p. 107–112. 1970.

Gunter, N; Whipps, C.N; Adlard, R. (2009). *Ceratomyxa* (Myxozoa: bivalvulida): robust taxon or genus of convenience? Inter. J. Parasitol. 39, 1395–1405. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.008.

Heckel, J. 1840. Johann Natterer's neue Flussfische Brasilien's nach den Beobachtungen und Mittheilungen des Entdeckers beschrieben. (Erste Abtheilung, die Labroiden.) Annalen des wiener Museums der Naturgeschichte, 2: 327-470.

Heiniger, H; Adlard, RD. (2014). Relatedness of novel species of *Myxidium* Bütschli, 1882, Zschokkella Auerbach, 1910 and *Ellipsomyxa* Køie, 2003) (Myxosporea: bivalvulida) from the gall bladders of marine fishes (Teleostei) from Australian waters. Syst. Parasitol. 87, 47–72. DOI: https://doi.org/10.1007/s11230-013-9454-3.

Koie, M. (2003). *Ellipsomyxa gobii* gen. et sp. n. (Myxozoa: Ceratomyxidae) in the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei: Gobiidae) from Denmark. *Folia parasitologica*, 50(4), 269-271.

Lom, J. & Dyková, I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. Folia parasitologica, [s. l], v. 53, n. 1, p. 1-36. DOI: 10.14411/fp.2006.001.

Naldoni, J; Arana, S; Maia, AAM; Ceccarelli, PS; Tavares, LER; Borges, FA; Pozo, CF; Adriano, EA. (2009). *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a South American catfish: histopathology and ultrastructure. Veterinary Parasitology (Print), v. 166, p. 52-59. DOI: DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.034.

Nelson, JS; Grande, TC; & Wilson, MV. (2016). Fishes of the World. John Wiley & Sons.

Okamura, B., Gruhl, A. & Bartholomew, J.L. (2015). An introduction to myxozoan evolution, ecology and development. In: Okamura, B., Gruhl, A. & Bartholomew, J.L. (Eds.) Myxozoan evolution, ecology and development. Switzerland: Springer International Publishing, pp. 1–22. DOI: <u>https://doi.org/10.1007/978-3-319-14753-6_1</u>.

Okamura, B., Hartigan, A. & Naldoni, J. (2018). Extensive uncharted biodiversity: the parasite dimension. Integrative and Comparative Biology, 6, 1132–114515. DOI: <u>https://doi.org/10.1093/icb/icy039</u>.

Santos, GMD; Ferreira, EJG. & Zuanon, JAS. (2009). Peixes comerciais de Manaus. editora INPA.

Schmahl. G; Mehlhorn, H; Taraschewski, H. (1989). Treatment of fish-parasites 7. Effects of sym. Tirazinome (Toltrazuril) on developmental stages of Myxobolus sp. Buetschli, 1882 (Myxosporea, Mixozoa): a light an electron microscopic study. Eur. J. Protistol., v. 25, n.1, p. 25-32. DOI: <u>https://doi.org/10.1016/S0932-4739(89)80075-6</u>.

Silva, DT; Matos, PS; Lima, AM; Furtado, AP; Matos, ER. (2018). *Ellipsomyxa arariensis* n. sp. (Myxozoa: Ceratomyxidae), a new myxozoan parasite of *Pygocentrus nattereri* Kner, 1858 (Teleostei: Characidae) and Pimelodus ornatus Kner, 1858 (Teleostei: Pimelodidae) from Marajó Island, in the Brazilian Amazon region. Parasitology Research 117:3537–3545. DOI: <u>https://doi.org/10.1007/s00436-018-6051-z</u>.

Silvano, RA; Nitschke, PP; Vieira, KC; Nagl, P; Martínez, AT; Dutra, MC. ... & Andrade, MC. (2020). Atlas of Fish of Tapajós and Negro Rivers III: Perciformes and Other Fish Groups. In *Fish and Fisheries in the Brazilian Amazon* (pp. 321-414). Springer, Cham.

Steindachner, F. 1875. Beiträge der Kenntniss der Chromiden des Amazonenstromes. Sitzungsberichte der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften, Mathematisch-naturwissenschaftiche Classe, 71: 61-137.

Székely, C; Cech, G; Atkinson, S.D; Molnár, K; Egyed, L; Gubanyi, A. (2015). A novel myxozoan parasite of terrestrial mammals: description of *Soricimyxum minuti* sp. n. (Myxosporea) in pygmy shrew Sorex minutus from Hungary. Folia Parasitologica, 62: 1–5. DOI: <u>http://dx.doi.org/10.14411/fp.2015.045</u>.

Zatti, AS; Atkinson, SD; Maia, AA; Corrêa, LL; Bartholomew, JL. & Adriano, EA. (2018). Novel *Myxobolus* and *Ellipsomyxa* species (Cnidaria: Myxozoa) parasiting *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin, Brazil. *Parasitology international*, 67(5), 612-621.

Zatti, SA; Maia, AAM; Adriano, EA. (2020). Growing diversity supports radiation of an *Ellipsomyxa* lineage into the Amazon freshwater: Description of two novel species parasitizing fish from Tapajós and Amazon rivers. Acta Tropica 211. 105616. DOI: <u>https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105370</u>.

9. ANEXOS

Anexo 1: Licença de experimentação animal concedida pelo CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da Unifesp (Universidade Federal de São Paulo).



Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 29 de setembro de 2020 CEUA N 6549290920

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PROPOSTA À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CPF:	080.457.968-71									
Título do projeto:	Perfil de múltiplas-ômicas pa doce da Bacia Amazônica	erfil de múltiplas-ômicas para revelar a biodiversidade de mixozoáriostropicais em hospedeiros de peixes de água loce da Bacia Amazônica								
Responsável:	Edson Aparecido Adriano	Edson Aparecido Adriano								
Equipe:	Edson Aparecido Adriano, Jul	liana Naldoni								
Telefone:	19-992330364	e-mail:	edapadriano@gmail.com							

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, avaliará os documentos seguindo calendário de reuniões vigentes. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema (http://ceua.sirpp.unifesp.br) por meio da sua senha de acesso.

Dammesannes

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Kátia De Angelis Lobo d'Avila Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de São Paulo

Rua Botucatu, 740 - 2º andar - Vila Clementino - CEP 04023-061 - São Paulo/SP - tel: +55 (11) 5576-4848 Horário de atendimento: 2ª a 6ª, das 8h às 12h e das 14h às 17h : e-mail: ceuasecretaria@gmail.com CEUA N 6549290920 - 23/06/2022 15:19:48



Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA N: 6549290920

Título: "Perfil de múltiplas-ômicas para revelar a biodiversidade de mixozoáriostropicais em hospedeiros de peixes de água doce da Bacia Amazônica"

Pesquisador: Edson Aparecido Adriano Área: Ciências Biológicas

JUSTIFICATIVA (EMENDA) (ID 040233)

Solicitamos alteração na equipe do Projeto.

Inclusão de RAYLINE THAIMENNE ALVES FIGUEREDO - Aluna de Mestrado em Biologia Animal, e colaboradora em nosso grupo de pesquisa, onde desenvolve parte do seu projeto de mestrado com material relacionado a esse projeto de pesquisa.

MEMBROS ADICIONADOS OU REMOVIDOS DA PROPOSTA

Pesquisador ADICIONADO:

E-mail:	rayline.figueredo@gmail.com	Telefone:	91 9226 8051
Nome:	Rayline Thaimenne Alves Figueredo		
Instituição:	Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP	Nível:	Graduado
Vínculo:	Aluno de pós-graduação		
Experiência:	Sim: 2 anos	Treinamento:	Não:
Cv. Lattes:	http://lattes.cnpq.br/1466630270971213		
Setor:	Biologia Animal	Função:	Executante
Obs:			

Anexo 2: Declaração que a dissertação não infringe os dispositivos da lei nº9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Diversidade e interação parasito-hospedeiro de Myxozoa parasitos de Ciclídeos da bacia amazônica**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 13 de janeiro de 2023



Assinatura : _____ Nome do(a) autor(a): RAYLINE THAIMENNE ALVES FIGUEREDO RG n.° 6134527



Assinatura : ______ Nome do(a) orientador(a): EDSON APARECIDO ADRIANO RG n.° 18.015.128-9