MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE PEIXES CONTINENTAIS

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA-PIBIC/ICMBio

Composição parasitológica de *Pseudopimelodus mangurus* (Valenciennes, 1840):
uma abordagem epidemiológica

Bolsista: José Octávio de Lima Pereira

Orientador: Dr. Paulo Sérgio Ceccarelli

Co-orientador: MSc. Julio Cesar Cenci de Aguiar

PIRASSUNUNGA - SP

Segundo Semestre de 2014

RESUMO

Pseudopimelodus mangurus (Valenciennes, 1840) é uma espécie de peixe siluriforme, ameaçada de extinção (categoria VU A2c no Estado de São Paulo), encontrada na área de abrangência do PAN Mogi-Pardo-Grande. Entre as ações de conservação para P. mangurus está a formação de um plantel em ambiente ex situ no CEPTA/ICMBio para estudos genéticos e reprodutivos. Contudo, a manutenção de espécies de peixes ameaçadas de extinção fora do seu habitat natural pode ser dificultada pelas doenças parasitárias que acometem esses peixes. A fim de avaliar a dinâmica da fauna parasitária associada aos espécimes de P. mangurus em diferentes ambientes ex situ, conduzimos um estudo observacional no qual avaliamos a influência do uso de NaCl na concentração de 1:10000 em tanques estufa e em caixas de alvenaria do quarentenário do laboratório de Ictiopatologia do CEPTA/ICMBio. Foram coletados 40 exemplares de P. mangurus do rio Mogi-Guaçu entre os meses de julho a novembro de 2013. Sete peixes foram necropsiados e o restante dividido em duas populações de 14 peixes, os quais foram destinados aos tanques estufa. Antes de serem deslocados, os peixes foram medidos, pesados e foi feito um raspado de pele e brânquias. Esse procedimento foi repetido mensalmente. Amostras de sangue também foram coletadas visando o diagnóstico de hemoprotozoários e, posteriormente esse procedimento foi realizado bimensalmente. Uma das populações do tanque estufa recebeu um banho de NaCl todo mês, de outubro de 2013 a dezembro de 2013. Após surtos epizoóticos e mortandades nos tanques estufa, os peixes foram transferidos de volta aos tanques do quarentenário, onde, após nova aclimatação foram divididos em duas populações de 7 peixes. Uma dessas populações recebeu um tratamento de NaCl mensalmente de fevereiro a junho de 2014. Peixes mortos durante o período de observação foram necropsiados. O comprimento e o peso dos peixes, bem como as abundâncias parasitárias foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de *Tukey*. Não houve diferenças significativas (p>0,05) no comprimento e

peso dos peixes dos diferentes tratamentos. Peixes provenientes do rio apresentaram associação com 5 espécies de parasitas: Trypanosoma sp., Austrodiplostomum compactum, Prostenhystera obesa, Phanerothecium sp. e Cucullanus sp.. A composição e a estrutura da comunidade parasitária dos peixes do rio mudaram quando os peixes foram transferidos para o ambiente ex situ. Peixes do ambiente ex situ apresentaram maior riqueza de parasitas. Surgiram três novas associações parasitárias nos peixes da estufa de ambos os tratamentos, com e sem NaCl, com Flexibacter columnaris, Trichodina sp. e Piscinoodinium pillulare, embora tenha desaparecido *Phanerothecium* sp.. Nos peixes mantidos em ambos os tratamentos do quarentenário, comparado com peixes da estufa, ainda surgiu Ichthyophthririus multifillis. Portanto, três espécies de parasitas foram compartilhadas entre peixes do rio e peixes da estufa e, apenas duas espécies foram compartilhadas entre peixes do rio e peixes do quarentenário. Peixes mantidos na estufa compartilharam seis espécies de parasitas com peixes mantidos no quarentenário. Esses resultados denotam que a fauna parasitária associada a espécimes de *P. mangurus* em ambiente *ex situ* é mais rica e similar, reforçando que esses peixes são susceptíveis a novas associações parasitárias decorrentes de processos de transferência horizontal propiciados pela alteração de seu hábitat e estresse ocasionado pelo manejo. Quando peixes do ambiente ex situ mantiveram as associações parasitárias naturais, as maiores abundâncias de infecção (p<0,05) foram observadas em peixes do rio.

ABSTRACT

Pseudopimelodus mangurus (Valenciennes, 1840) is a kind of siluriforme fish, endangered (category VU A2c in the State of São Paulo), found in the area covered by the PAN Mogi-Pardo-Grande. Among the actions for the conservation of P. mangurus is the formation of a squad in the environment ex situ CEPTA / ICMBio for genetic and reproductive studies. However, the maintenance of species of endangered fish outside their natural habitat can be hampered by parasitic diseases that affect these fish. In order to evaluate the dynamics of the parasitic fauna associated with specimens of P. mangurus ex situ in different environments, we conducted an observational study in which we assessed the influence of using the NaCl concentration of 1:10,000 in greenhouse tanks and boxes in masonry quarantine of the lab Ictiopatologia CEPTA / ICMBio. 40 specimens of P. mangurus of Mogi Guacu between the months from July to November 2013 were collected. Seven fish were necropsied and the remainder divided into two populations of 14 fish, which were intended to estufa. Before being moved, the fish were weighed, measured and was made a skin scrapes and gill. This procedure was repeated monthly. Blood samples were also gathered with the diagnosis of hemoprotozoários and then this procedure was performed bimonthly. One of the populations of the greenhouse tank received a NaCl bath every month, from October 2013 to December 2013. Upon epizootic outbreaks and mortalities in greenhouse tanks, fish were transferred back to the quarantine tanks where, after further acclimatization were divided 7 in two populations of fish. One of these populations received a treatment of NaCl monthly from February to June 2014. Fish died during the observation period were necropsied. The length and the weight of the fish and the parasitic abundances were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test. There were no significant differences (p> 0.05) in length and weight of fish of different treatments. Fish from the river were associated with 5 species of parasites:. Trypanosoma sp, Austrodiplostomum compactum, obese Prostenhystera, Phanerothecium sp. Cucullanus and sp .. The composition and structure of the parasite community of fish in the river changed when the fish were transferred to the ex situ environment. Fish environmental ex situ showed greater richness of parasites. Emerged three new parasitic associations in fish Kiln both treatments, with and without NaCl, with Flexibacter columnaris, Trichodina sp. and Piscinoodinium pillulare but disappeared Phanerothecium sp... In fish kept in quarantine both treatments, compared with fish from the oven, yet arose multifillis Ichthyophthririus. Therefore, three species of parasites were shared between river fish and fish from the oven and, only two species were shared between river fish and fish quarantine. Fish kept in the greenhouse shared six species of parasites with fish kept in quarantine. These results denote that the parasitic fauna associated with specimens of P. mangurus in ex situ environment is richer and more similar, reinforcing that these fish are susceptible to new parasitic associations arising from horizontal transfer processes enabled by the alteration of their habitat and stress caused by management. When the fish environment ex situ maintained the natural parasitic associations, the greatest abundance of infection (p <0.05) were observed in fish from the river.

LISTA DE SIGLAS

ABM Abundância Média de Infecção

CEPTA Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais

CIEE Centro de Integração de Empresa-Escola

ICMBio Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IMI Intensidade Média de Infecção

gen. Gênero

MG Minas Gerais

MMA Ministério do Meio Ambiente

PAN Plano de Ação Nacional

P% Prevalência

SP Estado de São Paulo

spp. Espécies

E1 Tanque de alvenaria estufa sem uso do NaCl

E2 Tanque de alvenaria estuda com uso do NaCl

Q1 Tanque de alvenaria do quarentenário sem o uso do NaCl

Q2 Tanque de alvenaria do quarentenário com o uso do Nacl

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Pseudopimelodus mangurus proveniente rio Mogi-Guaçu, Cachoeira de Emas	3,
<u>Pirassununga - SP Foto: José Octávio de Lima Pereira, 2013 barra de escala = 5cm</u> 1	3
Figura 2 – Local de coleta dos hospedeiros, no rio Mogi-Guaçu próximo à localidade d	<u>e</u>
Cachoeira de Emas, Pirassununga, Estado de São Paulo (estrela amarela). Map	<u>a</u>
elaborado por Fernando Rocchetti dos Santos.	7
Figura 3 Diferentes populações com inter-relação de parasitas entre o rio,E1;E2;Q1;Q2 2	5
Figura 4 Comprimento (A) e peso(B) (Log x+1) dos exemplares de <i>Pseudopimelodu</i>	S
mangurus do rio Mogi Guaçu e em ambiente ex situ 2	6
Figura 5 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média de infestação(C) po	r
Phanerothecium sp. parasita de Pseudopimelodus mangurus do rio Mogi Guaçu e er	<u>n</u>
ambiente ex situ, Pirassununga, São Paulo 2	8
Figura 6 Prevalência(A) e abundância média de infestação(B) por <i>Prostenhystera obes</i>	<u>a</u>
parasita de Pseudopimelodus mangurus do rio Mogi Guaçu e em ambiente ex situ	<u>ı,</u>
<u>Pirassununga, São Paulo</u>	0
Figura 7 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média de infestação(C) po	r
Austrodiplostomum compactum parasita de Pseudopimelodus mangurus do rio Mog	<u>;i</u>
Guaçu e em ambiente <i>ex situ</i> , Pirassununga, São Paulo	1
Figura 8 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média de infestação(C) por Cucullanu	S
sp. parasita de <i>Pseudopimelodus mangurus</i> do rio Mogi Guaçu e em ambiente <i>ex situ</i>	ι,
<u>Pirassununga, São Paulo</u>	3
Figura 9 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média de infestação(C) por <i>Trichodin</i>	<u>a</u>
sp. na pele de <i>Pseudopimelodus mangurus</i> do rio Mogi Guaçu e em ambiente <i>ex situ</i>	<u>ι,</u>
Pirassununga, São Paulo 3	5

Figura 10 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média	de infestação(C) por
Trichodina sp. nas brânquias de Pseudopimelodus mangurus do	o rio Mogi Guaçu e em
ambiente ex situ, Pirassununga, São Paulo	37
Figura 11 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média	de infestação(C) por
Piscinoodinium pilullare (tomonte) na pele de Pseudopimelodus	mangurus do rio Mogi
Guaçu e em ambiente ex situ, Pirassununga, São Paulo	39
Figura 12 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média	de infestação(C) por
Piscinoodinium pilullare (tomonte) nas brânquias de Pseudopimo	elodus mangurus do rio
Mogi Guaçu e em ambiente ex situ, Pirassununga, São Paulo	41
Figura 13 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média	de infestação(C) por
Piscinoodinium pilullare (trofonte) na pele de Pseudopimelodus	mangurus do rio Mogi
Guaçu e em ambiente ex situ, Pirassununga, São Paulo	42
Figura 14 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média o	de infestação(C) por
Piscinoodinium pilullare (trofonte) nas brânquias de Pseudopime	elodus mangurus do rio
Mogi Guaçu e em ambiente ex situ, Pirassununga, São Paulo	43
Figura 15 Prevalência e densidade média de infecção por Trypanos	oma sp. nos sangue de
Pseudopimelodus mangurus do rio Mogi Guaçu e em ambiente	e ex situ, Pirassununga,
São Paulo	44
Figura 16 Prevalência, abundância e intensidade média de infestaçã	ão por <i>Ichthyophthirius</i>
multifiliis na pele de Pseudopimelodus mangurus do rio Mogi G	Suaçu e em ambiente <i>ex</i>
situ, Pirassununga, São Paulo	46
Figura 17Prevalência, abundância e intensidade média de infestaçã	ão por <i>Ichthyophthirius</i>
multifiliis nas brânquias de Pseudopimelodus mangurus do r	rio Mogi Guaçu e em
ambiente ex situ, Pirassununga, São Paulo	48

Figura 18 Número e porcentagem de <i>Pseudopimelodus mangurus</i> mortos em ambiente <i>ex situ</i> ,
<u>Pirassununga, São Paulo</u> 50
Figura 19 Lesão provocada por Flexibacter columnaris na parte ventral do P. mangurus. barra
<u>de escala = 5cmFoto : José Octávio de Lima Pereira, 2013</u> 53
Figura 20 Flexibacter columnaris encontrada infestando Pseudopimelodus mangurus, barra
<u>de escala = 10μm Foto: José Octávio de Lima Pereira, 2013</u> 54
Figura 21 Protozoários encontrados em Pseudopimelodus mangurus. A forma de
<u>Tripomastigota de <i>Trypanosoma</i>sp. encontrada no esfregaço sanguíneo, indicado na seta, </u>
barra de escala = 20µm; B <i>Trichodina</i> sp. encontrada no raspado de pele, barra de escala
= 25μm Foto: José Octávio de Lima Pereira, 2013 55
Figura 22 Digenéticos encontrados em Pseudopimelodus mangurus; A Austrodiplostomum
compactum encontrada no olho de Pseudopimelodus mangurus,barra de escala = 200μm;
BProstenhystera obesa encontrado na vesícula biliar de Pseudopimelodus
mangurus, barra de escala = 2mmFoto: José Octávio de Lima Pereira, 2013 56
Figura 23 Piscinoodinium sp. encontrado no raspado de pele de Pseudopimelodus mangurus,
<u>barra de escala = 30μm Foto: José Octávio de Lima Pereira, 2013</u> 57
Figura 24Piscinoodinium sp. encontrado no raspado de pele de Pseudopimelodus mangurus,
barra de escala = 30μm Foto: José Octávio de Lima Pereira, 2013 57
Figura 25 Gyrodactylidae <i>Phanerothecium</i> sp.; A Parasita inteiro barra de escala = 100μm;
B,C ovos de <i>Phanerothecium</i> sp.barra de escala = 50μm; D órgão copulatório masculino
de Phanerothecium sp. indicado na seta,barra de escala = 25µm; E,F haptor de
Phenerothecium sp., barra de escala = 25μm Foto: José Octávio de Lima Pereira, 2013 58
Figura 26 Cucullanus sp. A Região anterior da fêmea barra de escala =100µm, B Região
posterior da Fêmea barra de escala = 100µmFoto: José Octávio de Lima Pereira, 2013, 59

LISTA DE TABELAS

Tabela I Descritores quantitativos do parasitismo de Pseudopimeioaus mangurus
provenientes do rio Mogi-Guaçu, Cachoeira de Emas, Pirassununga, Estado de São
Paulo. P% = Prevalência; ABM= Abundância média; IMI= Intensidade Média de
<u>Infecção</u> ; <u>Sitio</u> = microhábitat onde o parasita foi encontrado 25
Tabela 2 Teste de <i>Tukey</i> * (Q) aplicado para verificar diferenças na prevalência e abundância e
intensidade média de infestação por Phanerothecium sp. parasita de Pseudopimelodus
mangurus do rio Mogi Guaçu e em ambiente ex situ, Pirassununga, São Paulo 31
Tabela 3 Teste de <i>Tukey*</i> (Q) aplicado para verificar diferenças na prevalência de infestação
por Austrodiplostomum compactum parasita de Pseudopimelodus mangurus do rio Mogi
Guaçu e em ambiente <i>ex situ</i> , Pirassununga, São Paulo
Tabela 4 Teste de <i>Tukey*</i> (Q) aplicado para verificar diferenças na abundância média de
infestação por Cucullanus sp. parasita de Pseudopimelodus mangurus do rio Mogi
Guaçu e em ambiente ex situ, Pirassununga, São Paulo
Tabela 5 Teste de <i>Tukey*</i> (Q) aplicado para verificar diferenças na prevalência e abundância
média de infestação por <i>Trichodina</i> sp. parasita da pele de <i>Pseudopimelodus mangurus</i>
do rio Mogi Guaçu e em ambiente <i>ex situ</i> , Pirassununga, São Paulo 38
Tabela 6 Teste de <i>Tukey*</i> (Q) aplicado para verificar diferenças na abundância média de
infestação por <i>Trichodina</i> sp. parasita das brânquias de <i>Pseudopimelodus mangurus</i> do
rio Mogi Guaçu e em ambiente <i>ex situ</i> , Pirassununga, São Paulo 40
Tabela 7 Teste de <i>Tukey*</i> (Q) aplicado para verificar diferenças na intensidade média de
infestação por Piscinoodinium pilullare (tomonte) na pele Pseudopimelodus mangurus
do rio Mogi Guaçu e em ambiente <i>ex situ</i> , Pirassununga, São Paulo 42

Tabela 8Teste de Tukey* (Q) aplicado para verificar diferenças na abundância média	de
infestação por <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> na pele de <i>Pseudopimelodus mangurus</i> do	<u>rio</u>
Mogi Guaçu e em ambiente ex situ, Pirassununga, São Paulo	49
Tabela 9 Teste de Tukey* (Q) aplicado para verificar diferenças na prevalência de infestaç	ção
por Ichthyophthirius multifiliis nas brânquias de Pseudopimelodus mangurus do rio Mo	<u>ogi</u>
Guaçu e em ambiente ex situ, Pirassununga, São Paulo	51
Tabela 10 Teste de Tukey* (Q) aplicado para verificar diferenças no número	de
Pseudopimelodus mangurus mortos em ambiente ex situ, Pirassununga, São Paulo	53
Tabela 11 Teste de Tukey* (Q) aplicado para verificar diferenças na porcentagem	de
Pseudopimelodus mangurus mortos em ambiente ex situ, Pirassununga, São Paulo.	54

SUMÁRIO

RESUMO	10
<u>ABSTRACT</u>	3
LISTA DE SIGLAS	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	10
<u>SUMÁRIO</u>	12
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 PLANO DE AÇÃO NACIONAL MOGI-PARDO-GRANDE	14
1.2 CONSERVAÇÃO EX SITU	15
1.3 PSEUDOPIMELODUS MANGURUS (VALENCIENNES, 1840)	15
1.4 PARASITOFAUNA ASSOCIADA À PSEUDOPIMELODUS MANGURUS	16
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2.1 IDENTIFICAR OS PARASITAS ASSOCIADOS A P. MANGURUS PROVENIENTES DO RIO MOGI-GUAÇI	<u>U;</u> 19
2.2 IDENTIFICAR A PARASITOFAUNA E A DINÂMICA DOS PARASITAS ASSOCIADOS A P. MANGUA	RUS EM
AMBIENTE EX SITU;	19
2.4 AVALIAR A EFICÁCIA DO NACL COMO MEDIDA PROFILÁTICA NO CONTROLE DAS PARASITOS	ES NOS
TANQUES ESTUFA DE ALVENARIA E NOS TANQUES DE ALVENARIA DO QUARENTENÁRIO.	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 COLETA DOS PEIXES	19
3.2 DELINEAMENTO OBSERVACIONAL	20
3.3 NECROPSIA, COLETA, PROCESSAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS PARASITAS	23
3.4 ANÁLISE DA DINÂMICA PARASITÁRIA DE P. MANGURUS COM E SEM O USO DE NACL	24
3 RESULTADOS	25
3.1 PEIXES COLETADOS E OBSERVADOS	25

3.2 PARASITOFAUNA DE <i>PSEUDOPIMELODUS MANGURUS</i> DO RIO MOGI-GUAÇU	25
3.3 DINÂMICA DA FAUNA PARASITARIA DE P. MANGURUS E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA	DO USO DO SAL
(NACL)	26
<u>5 – DISCUSSÃO</u>	63
<u>6 – AGRADECIMENTOS</u>	64
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plano de Ação Nacional Mogi-Pardo-Grande

O Plano de Ação Nacional para a Conservação das espécies ameaçadas da fauna aquática do ecossistema formado pelos rios Mogi-Guaçu, Pardo e Grande (PAN Mogi-Pardo-Grande) foca suas atividades em um recorte da bacia do rio Paraná, que inclui os rios Mogi-Guaçu, Pardo e parte do Grande, com aproximadamente 37.379,09 Km².

Em 2009, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), tendo como suporte a Portaria nº 316/2009, em conjunto com o Ministério do Meio Ambiente, e a Portaria nº 78/2009 do ICMBio, estabeleceu uma estratégia para elaboração e implementação dos Planos de Ação, envolvendo instituições parceiras coordenadas pelos centros de pesquisa e conservação do Instituto. O Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – CEPTA é responsável pela coordenação do PAN Mogi-Pardo-Grande.

A preparação do PAN foi realizada em duas etapas que incluíram a definição do objetivo geral, informações sobre a bacia e as espécies-alvo, consolidação e identificação de uma rede de parceiros, identificação dos problemas e dos respectivos objetivos específicos e ações voltadas para a conservação das espécies listadas como Ameaçadas na região. O PAN Mogi-Pardo-Grande busca atuar nos próximos oito anos, por meio de 42 ações propostas por um conjunto de parceiros interinstitucionais dentro de seis objetivos específicos, visando à conservação da biodiversidade destas bacias.

Ao todo, 14 espécies ameaçadas de extinção são contempladas pelo PAN dentre elas esta o *Pseudopimelodus mangurus* (Valenciennes, 1840), espécie de peixe categorizada como ameaçada de acordo como Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MMA, 2008).

1.2 Conservação ex situ

Estudos que visem à implementação de medidas de conservação, tais como a elaboração de Planos de Ação para as espécies ameaçadas de extinção, tornam-se fundamentais para a manutenção da biodiversidade. Porém, algo que pode somar e contribuir para essas ações é a conservação ex situ (IUCN, 1987; GORDON et al. 2005). Estratégias de conservação adaptativas são necessárias para garantir o futuro de um mundo natural e novas sugestões de conservação estão começando vir à tona, com o ecossistema aproximar a pratica principal para a gestão da conservação (SHEPPERD, 2008; CBD, 2012). A manutenção de espécies ameaçadas de extinção em ambiente ex situ é uma importante fonte de estudos para avaliar a viabilidade populacional (OOSTERHOUT et al., 2007), sobretudo se a reintrodução para o aumento da biodiversidade ou preenchimento de um nicho ecológico é desejada (NEVES, 2004; ARAKI et al., 2007). Entretanto a manutenção de espécies de peixes em cativeiro não é uma tarefa fácil exigindo um conhecimento do comportamento das espécies em seu ambiente natural e sua adaptação em ambientes controlados.

A conservação "ex situ" ajuda na gestão das espécies que saíram do seu habitat natural (ENGELMANN; ENGELS, 2002). Ambientes ex situ podem assim servir como modelos de estudo para investigar melhores condições sanitárias para as espécies criadas em cativeiro.No Brasil a falta de trabalhos sobre tecnologias de prevenção e tratamento das enfermidades de peixes tem sido um dos principais entraves no desenvolvimento da atividade aquícola. As mortalidades verificadas neste ambientes têm inviabilizado a manutenção, em viveiros "ex situ", da maioria das espécies de peixes ameaçadas de extinção. (SULLIVAN, M. 2010)

1.3 Pseudopimelodus mangurus (Valenciennes, 1840)

O jaú-sapo ou peixe-sapo, *Pseudopimelodus mangurus* (Figura 1), é uma espécie de biologia pouco conhecida. A espécie *P. mangurus* ocorre nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai. Em São Paulo, pode ser encontrado nas bacias dos rios Grande, Tietê, São José dos Dourados, Paraná e Paranapanema. Vive nas regiões profundas de rios de médio a grande porte, em meio a rochas e troncos submersos (ICMBio, 2010).

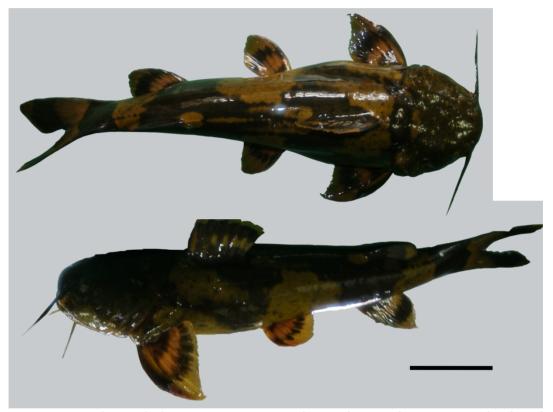


Figura 1 *Pseudopimelodus mangurus* proveniente rio Mogi-Guaçu, Cachoeira de Emas, Pirassununga - SP Foto: José Octávio de Lima Pereira, 2013 barra de escala = 5cm

1.4 Parasitofauna associada à Pseudopimelodus mangurus

Parasitas exercem importantes funções nos ecossistemas naturais e são encontrados em associação com a maioria das espécies de animais de vida livre (GASTON, 2010). Além de sua função óbvia de controle populacional (SCHMIDT; ROBERTS, 2009), os parasitas agem em nível de seleção natural, condicionando os hospedeiros a diversificarem-se cada vez mais

(COMBES, 2005) e, quando não encontram um hospedeiro adequado, ainda constituem uma fonte alimentar para outros organismos (JOHNSON *et al.* 2010).

Espécies do gênero *Pseudopimelodus* estão distribuídas pela América do Sul desde o rio Atrato na Colômbia até o rio de la Plata, na Argentina (SHIBATA, 2003), porém os registros parasitários para peixes desse gênero são confusos. No Brasil há registros do protozoário Trypanosoma zungaro; do mixozoário Henneguya lutzi Cunha & Fonseca, 1918; dos nematóides Rondonia rondoni Travassos, 1919, Cucullanus (Cucullanus) oswaldocruzi Vicente, Santos & Jardim, 1979, C. (Cucullanus) zungaro Vaz & Pereira, 1934 e Procamallanus (Spirocamallanus) iheringi Travassos, Artigas & Pereira, 1928; e do cestóide Amphoteromorphus parkarmoo Woodland, 1935; todos registros para Pseudopimelodus zungaro Humboldt, 1821(THATCHER, 2006). Esta espécie de peixe foi posteriormente sinonimizada com Zungaro zungaro (HUMBOLDT, 1821) (LUNDBERG & LITTMANN, 2003; FROESE & PAULY, 2012). Ainda no Brasil há registro dos digenéticos Prosthenhystera obesa (DIESING, 1850) em uma espécie não identificada de Pseudopimelodus; e Iheringtrema iheringi Travassos, 1948 para Pseudopimelodus roosevelti Borodin, 1927 (THATCHER, 2006), posteriormente sininimizado com P. mangurus (SHIBATA, 2003). Para espécies de Pseudopimelodus, o único registro realizado no Brasil, cujo nome da espécie é considerado válido, foi realizado em Cachoeira de Emas, em Pirassununga, Estado de São Paulo, com o encontro de C. (Cucullanus) pinnai pinnai Travassos, Artigas & Pereira, 1928 em P. mangurus (KOHN & FERNANDES, 1987; LUQUE et. al, 2011), parasita já registrado em 20 espécies de peixes de três bacias hidrográficas brasileiras.

Na Colômbia foi realizado o registro de um monogenóideo da família Dactylogyridae, Ameloblastella mamaevi (KRITSKY & THATCHER, 1976) coletado de Cephalosilurus zungaro (Humboldt) (KRITSKY & THATCHER, 1976). O gênero Cephalosilurus foi sinonimizado com *Pseudopimelodus* e, posteriormente considerado válido (SHIBATA, 2003; ESCHMEYER, 2013). Outro monogenóideo, da família Gyrodactylidae, *Phanerothecium caballeroi* Kritsky & Thatcher, 1977 foi registrado na mesma espécie de peixe, *C. zungaro*, no México (THATCHER, 2006). Esse registro suscita ainda mais dúvidas, uma vez que mesmo considerando este hospedeiro como uma espécie de *Pseudopimelodus*, teríamos que negligenciar a informação de Shibata (2003), que as cinco espécies de *Pseudopimelodus* estão distribuídas pela América do Sul.

O adequado registro dos parasitas de *P. mangurus* é necessário para que entendamos a dinâmica parasitária, como e quando esses indivíduos tornam-se parasitados e por quais parasitas e ainda, que relevância isso pode ter para a manutenção desses espécimes em cativeiro, quando são rotineiramente estressados pelas condutas de manejo. Portanto é imprescindível saber se esses peixes tornam-se susceptíveis a infestação por outros parasitas quando em ambientes *ex situ* e, o que essa relação pode representar em termos de patogenicidade. Diante do exposto, a presente proposta traz como objetivo documentar a parasitofauna associada a *P. mangurus* selvagens e mantidos em ambiente *ex situ* e, analisar a dinâmica parasitária em ambientes *ex situ*, além de avaliar a eficiência do uso de NaCl como medida profilática.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1 Identificar os parasitas associados a *P. mangurus* provenientes do rio Mogi-Guaçu;
- 2.2 Identificar a parasitofauna e a dinâmica dos parasitas associados a *P. mangurus* em ambiente *ex situ*;
- 2.4 Avaliar a eficácia do NaCl como medida profilática no controle das parasitoses nos tanques estufa de alvenaria e nos tanques de alvenaria do quarentenário.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos peixes

O trabalho realizado durante o período compreendido entre julho de 2013 a junho de 2014 foi desenvolvido nas dependências do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA/ICMBio) localizado a 21°55'48"S/47° 22' 28,1"O em Pirassununga, Estado de São Paulo (Figura 2). Foram coletados quarenta exemplares de *P. mangurus* do rio Mogi-Guaçu (Figura 2) na localidade de Cachoeira de Emas entre o mês de julho a novembro de 2013. A coleta foi realizada usando espinhéis contendo iscas de lambaris e cascudinhos.

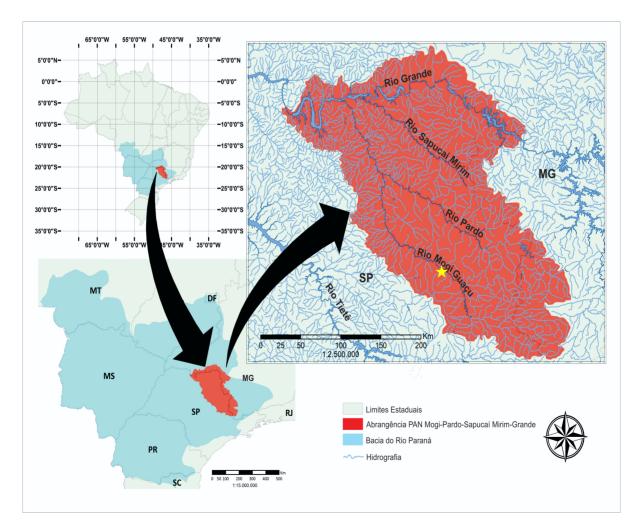


Figura 2 – Local de coleta dos hospedeiros, no rio Mogi-Guaçu próximo à localidade de Cachoeira de Emas, Pirassununga, Estado de São Paulo (estrela amarela). Mapa elaborado por Fernando Rocchetti dos Santos.

3.2 Delineamento observacional

Dos quarenta peixes coletados do rio Mogi Guaçu, sete foram necropsiados e, o trinta e três restantes foi mantido nos tanques de alvenaria do quarentenário (2m³) no começo do mês de outubro. Os peixes foram marcados, pesados, medidos e divididos em dois tanques de alvenaria do quarentenário, para um período de aclimatação. Durante esse período, peixes dos dois lotes foram tratados com oxitetraciclina (3g/1000L de água) e sal (1:20000). Esse tratamento prévio foi, devido a eventos de mortandade observados em consequência de septicemia ocasionada por ferimentos feitos no esôfago e estômago dos peixes, pelos anzóis engolidos no momento da captura. Já no meio do mês de outubro, 28 peixes foram divididos em dois grupos de quatorze e transferidos para dois tanques de alvenaria estufa (E1 e E2) (74m³ cada) (Figura3). Os cinco peixes restantes, por apresentarem letargia e indícios de anemia (caquexia e descoloração das extremidades das nadadeiras dorsal e caudal) foram mantidos nos tanques de alvenaria do quarentenário. Uma das populações do tanque estufa (E2) recebeu um tratamento de NaCl (na concentração 1:10000) e a outra (E1, sem uso de NaCl) foi o controle.

Em decorrência das mortandades e surto enzooótico que começou uma semana logo depois de colocar os peixes nos tanques E1 e E2 e se estendeu ate dezembro de 2013 os peixes foram transferidos de volta para os tanques de alvenaria do quarentenário no mês de janeiro de 2014. Posteriormente, um novo ambiente *ex situ* foi preparado para esses peixes, dessa vez, nos próprios tanques. Duas populações de sete peixes foram transferidas para dois

tanques. Uma das populações (Q1) foi o controle e não recebeu tratamento de NaCl. A outra (Q2) (Figura 3) recebeu tratamento de NaCl (1:10000).

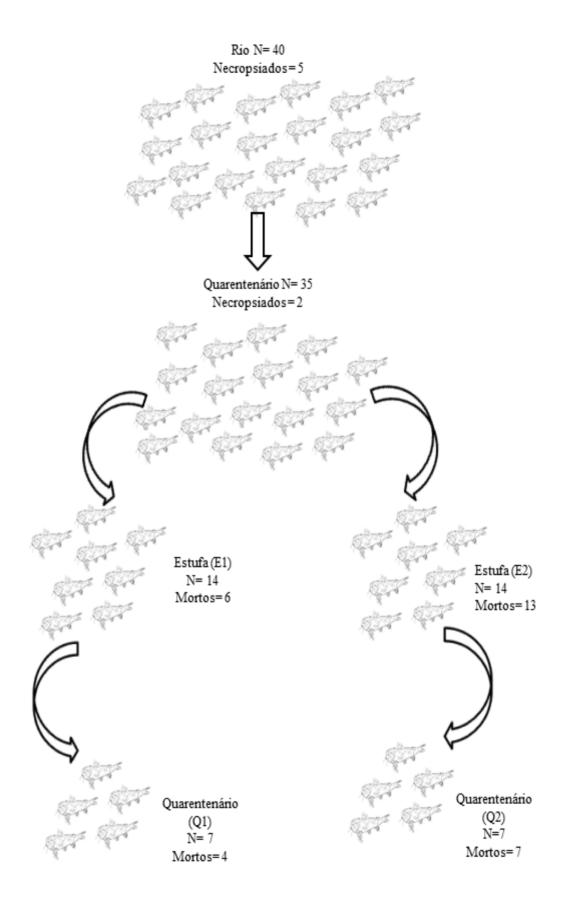


Figura 3 – Esquema de peixes das populações

3.3 Necropsia, coleta, processamento e identificação dos parasitas

Os raspados de pele e brânquias foram feitos nos peixes necropsiados para adicionalmente quantificar o ponto zero da associação parasitária. O raspado foi feito com lâminas e lamínulas do tamanho 22x22mm, e adicionamos água para posteriormente serem observadas em microscópio óptico. Com uma micropipeta colocamos uma alíquota de 0,2µL de sangue em uma lâmina para confeccionar o esfregaço sanguíneo para diagnose de hemoprotozoários, especialmente tripanossomatídeos (NEVES *et al.* 1974). O esfregaço sanguíneo em lâmina, depois de seco, foi fixado com metanol (P.A.) e corado com Giemsa para evidenciar os parasitas do gênero *Trypanosoma* (WOO, 1969; NEVES *et al.* 1974), metodologia também usada para coloração de lâminas contendo outros protozoários encontrados no raspado de pele e brânquias. A identificação desses parasitas foi realizada com a chave de identificação de (WOO, *et al.* 2006).

Monogenóideos coletados no raspado de pele foram fixados em formol 4%. Os endoparasitos que foram encontrados foram fixados em formol 4% ~65°C (AMATO *et al.* 1991). Para a coleta de endoparasitas foram retirados os órgãos da cavidade celomática do peixe. Para isso foi utilizada uma tesoura para um corte começando acima do ânus e se estendendo longitudinalmente até a cintura pélvica (AMATO *et al.* 1991).

Os monogenóideoss foram montados em lâminas em meio de *Grey & Wess* para estudo dos tecidos esclerotizados (órgão copulados masculino; vagina; barras; âncoras; e ganchos) usando lâminas e lamínulas, ou foram corados com Tricrômico de Gomori para observação dos tecidos moles (germário, testículo, reservatório prostático, vesícula seminal) (KRITSKY, *et al.*, 1986; BOEGER & VIANNA, 2006; AGUIAR *et al.*, 2011). A identificação foi feita com base na chave taxonômica proposta por Boeger e Vianna (2006) e no trabalho de Kritsky e Boeger (1991). A identificação dos nematóides encontrados foi realizada com base nas chaves de THATCHER (2006) e LUQUE, *et al.* (2011). Os digenéticos foram identificados de

acordo com KOHN *et al.* (1997). Esses parasitas foram identificados com uso de um microscópio óptico Physis ISH500.

3.4 Análise da dinâmica parasitária de P. mangurus com e sem o uso de NaCL

Os índices quantitativos de prevalência, incidência, abundância e intensidade parasitária serão os sugeridos por Bush *et al.* (1997). A prevalência é representada por P% (Nº de peixes coletados/ Nº de peixes infectado); a abundância media representada por ABM (Nº de Parasita/ Nº total de peixe); a intensidade media de infecção por IMI (Nº de parasita/ Nº de peixe infectado) BUSH et al. (1997).

As intensidades parasitárias quantificadas por raspados foram comparadas pelo teste ANOVA (F), com teste de Tukey, *a posterirori*, considerando os três diferentes tratamentos, T0 (raspados durante a necropsia), T1 (população que não recebeu banho de sal) e T2 (população que recebeu banho de sal). Os tratamentos T1 e T2 ainda serão monitorados a cada dois meses ao longo de 10 meses. Os peixes que porventura morrerem durante esse período, serão examinados e terão a composição da parasitofauna determinada, bem como os descritores quantitativos do parasitismo. Esses dados serão comparados também com T0, considerando as espécies de parasitas encontradas e a dinâmica nos valores de incidência, abundância e intensidade parasitária. Com isso os raspados de pele e brânquia dos peixes T1 e T2 serão feitos mensalmente e a coleta de sangue bimestralmente, podendo assim avaliar o uso efetivo ou não de NaCl. Esses dados irão compor uma base para que hipóteses parasitárias envolvendo aspectos bióticos relativos aos hospedeiros e aos parasitas, sejam testadas.

3 RESULTADOS

3.1 Peixes coletados e observados

Foram coletados 40 peixes da espécie *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi-Guaçu, Cachoeira de Emas, Pirassununga, Estado de São Paulo, no período de junho a novembro de 2013. Desses, sete (comprimento total = 32 ±10cm; peso = 600± 645g) foram necropsiados e 28 peixes foram divididos em dois tratamentos destinados aos tanques estufa de alvenaria. Um deles com 14 peixes (comprimento total [Ct] = 31,2 ± 6,5cm; peso [P] = 515,7 ± 505,6g), que foram designados E1, sem tratamento de NaCl. O outro, E2, contendo 14 peixes (Ct = 30,8 ± 6,4cm; P = 494,5 ± 377,1g) que receberam mensalmente um tratamento NaCl na concentração 1:10000. Cinco peixes foram mantidos no quarentenário por estarem letárgicos e apresentarem indícios de anemia (caquexia e descoloração das extremidades das nadadeiras dorsal e caudal). Com um evento de mortalidade e um surto enzooótico retiramos os peixes das estufas E1 e E2 e retornamos os exemplares de *P. mangurus* para os tanques de alvenaria do quarentenário (Q1 e Q2), Q1 foi o controle (sem NaCl) e o Q2 foi com o uso do NaCl. Foram colocados 7 peixes (Ct = 26,42± 5,4cm; P = 440± 400g) em cada tanque, que mensalmente o Q2 continuou a receber o tratamento com NaCl e o Q1 continuou sendo o controle.

3.2 Parasitofauna de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi-Guaçu

Os parasitas encontrados nos peixes provenientes do rio Mogi-Guaçu que foram necropsiados pertencem a três táxons superiores, Protozoa, Plathyelminthes e Nematoda. No esfregaço sanguíneo foi diagnosticada a presença e a concentração de hemoprotozoários *Trypanosoma* sp. (Figura 21A) com uma prevalência de infecção de 100% (Tabela 1). No

raspado de pele, podemos observar a presença de platelmintos como o girodactilideo *Phanerothecium* sp. (Figura 25) que foram encontrados em 2 de 7 peixes, tendo uma prevalência de 28,5%. Outro platelminto encontrado foi o digenético *Austrodiplostomun compactum* (Figura 22A), porém no olho, com 28,6% de prevalência. Na vesícula bilar foi encontrado o digenético *P. obesa* (Figura 22B), com uma prevalência de 100%. Representando os nematóides, observamos espécimes de *Cucullanus* sp. (Figura 26) (Tabela 1).

Tabela 1 Descritores quantitativos do parasitismo de *Pseudopimelodus mangurus* provenientes do rio Mogi-Guaçu, Cachoeira de Emas, Pirassununga, Estado de São Paulo. P% = Prevalência; ABM= Abundância média; IMI= Intensidade Média de Infecção; Sitio = microhábitat onde o parasita foi encontrado

Parasita	P%	ABM	IMI	SÍTIO
Protozoa				
Trypanosoma sp.	100	1,45*	1,45*	sangue
Platyhelminthes				
Prostenhystera obesa	100	2	2	vesícula biliar
Austrodiplostomum	28,6	0,7	2,5	olho
Ponpercotine cium sp.	28,5	0,4	1,5	pele
Nematoda				
Cucullanus sp.	28,5	0,4	1,5	intestino

^{*}Valores estimados para concentração de tripomastígotas por cada 1µL de sangue

3.3 Dinâmica da fauna parasitaria de *P. mangurus* e avaliação da influência do uso do sal (NaCl)

Peixes provenientes do rio apresentaram associações com 5 espécies de parasitas: Trypanosoma sp. (Figura 21A), Austrodiplostomum compactum (Figura 22A), Prostenhystera obesa (Figura 22B), Phanerothecium sp. (Figura 25) e Cucullanus sp. (Figura 26). A composição e a estrutura da comunidade parasitária dos peixes do rio alteraram quando os peixes foram transferidos para o ambiente ex situ. (E1;E2;Q1;Q2) Peixes do ambiente ex situ apresentaram maior riqueza de parasitas. Surgiram três novas associações parasitárias nos peixes da estufa de ambos os tratamentos, com e sem NaCl, como Flexibacter columnaris (Figura 20), Trichodina sp (Figura 21B). e Piscinoodinium pillulare (Figura 23), embora tenha desaparecido Phanerothecium sp.. Nos peixes mantidos em ambos os tratamentos do quarentenário. comparado com peixes da estufa, ainda surgiu *Ichthyophthririus multifillis* (Figura 27). Portanto, três espécies de parasitas foram compartilhadas entre peixes do rio e peixes da estufa e, apenas duas espécies foram compartilhadas entre peixes do rio e peixes do quarentenário. Peixes mantidos na estufa compartilharam seis espécies de parasitas com peixes mantidos no quarentenário (figura 3). Esses resultados denotam que a fauna parasitária associada a espécimes de P. mangurus em ambiente ex situ é mais rica e similar, reforçando que esses peixes são susceptíveis a novas associações parasitárias decorrentes de processos de transferência horizontal propiciados pela alteração de seu hábitat e estresse ocasionado pelo manejo. Quando peixes do ambiente ex situ mantiveram as associações parasitárias naturais, as maiores abundâncias de infecção (p<0,05) foram observadas em peixes do rio.

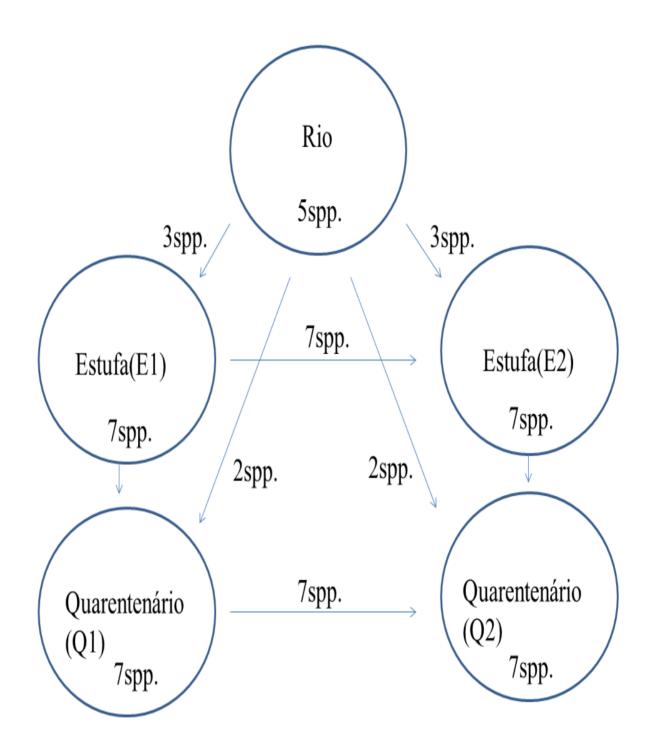


Figura 3 Diferentes populações com inter-relação de parasitas entre o rio,E1;E2;Q1;Q2

Não houve diferenças estatísticas no comprimento e peso dos peixes ao longo do período de observação (p>0.05) (Figura 4).

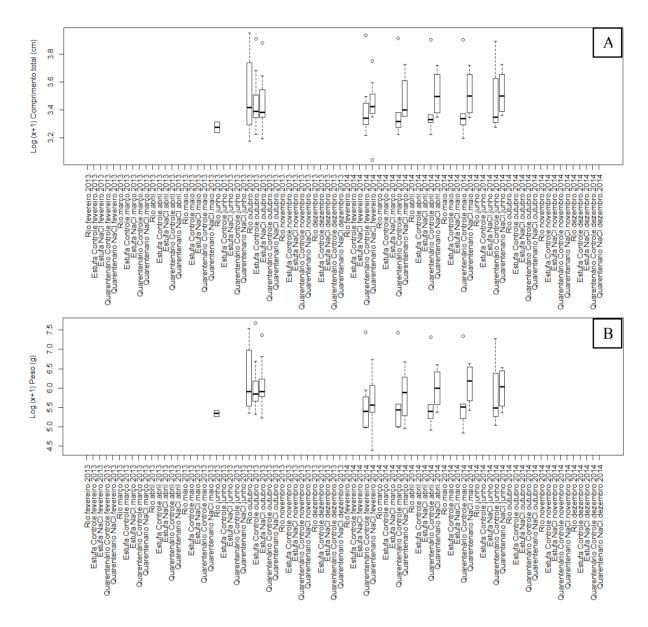


Figura 4 Comprimento (A) e peso(B) (Log x+1) dos exemplares de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*

A maior prevalência de infestação por *Phanerothecium* sp. foi observada no mês de junho em peixes provenientes do rio. Peixes do rio também apresentaram a maior abundância média de infestação. Contudo a intensidade média de infestação foi maior nos peixes da estufa controle do que no rio (Figura 5, Tabela 2). Porém, os peixes mantidos no ambiente *ex situ* ao longo do período de observação não mantiveram essa associação parasitária.

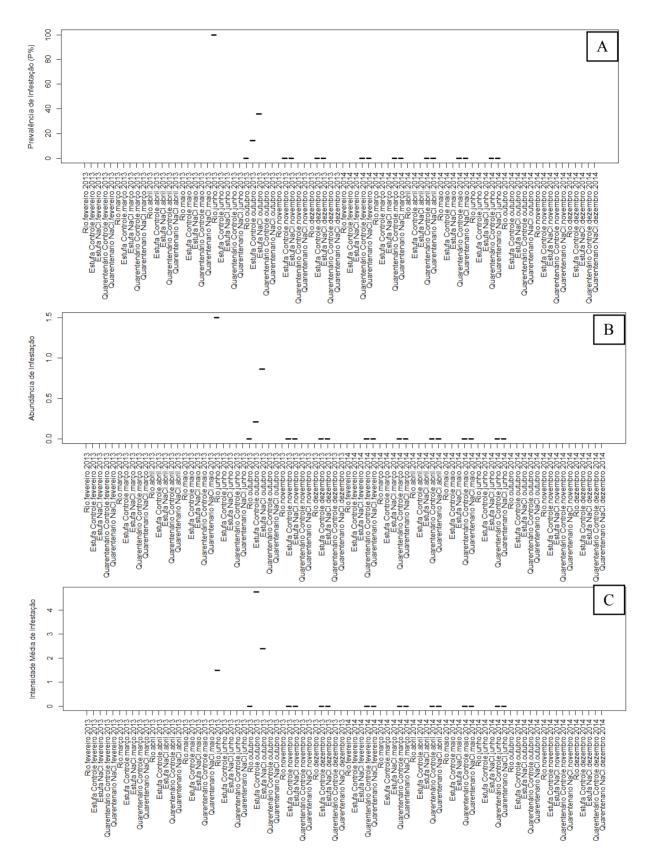


Figura 5 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média de infestação(C) por *Phanerothecium* sp. parasita de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Tabela 2 Teste de *Tukey** (Q) aplicado para verificar diferenças na prevalência e abundância e intensidade média de infestação por *Phanerothecium* sp. parasita de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Prevalência de Infestação							
Tratamento	Q	p-value	Período	Q	p-value		
Estufa Controle-Rio	0,00	0,00	outubro-junho	-2.22e+01	0.02		
Estufa NaCl-Rio	-11,90	0,00	novembro-junho	-2.50e+01	0.02		
Quarentenário Controle-Rio	-11,90	0,00	dezembro-junho	-2.50e+01	0.02		
Quarentenario NaCl-Rio	-4,8	0,00	-	-	-		
Abundância Média de Infestação							
Tratamento	Q	p-value	Período	Q	p-value		
Estufa Controle-Rio	-6,80	0,01	-	-	-		
Quarentenário Controle-Rio	-7.50e-01	0,01	-	-	-		
Quarentenario NaCl-Rio	-7.50e-01	0,01	-	-	-		
Intensidade Média de Infestação							

Tratamento	Q	p-value	Período	Q	p-value
Quarentenário Controle-	-1.59e+00	0,04	novembro-outubro	-2.53e+00	0,03
Estufa Controle Quarentenario NaCl-Estufa	-1.59e+00	0,04	dezembro-outubro	-2.53e+00	0,03
Controle					

^{*}Apenas valores significativos (*p*<0,05) são mostrados

Prostenhystera obesa apresentou 100% de prevalência de infecção durante todo o período observacional, para todos os tratamentos. Não houve diferença estatística para abundância e intensidade parasitária (Figura 6).

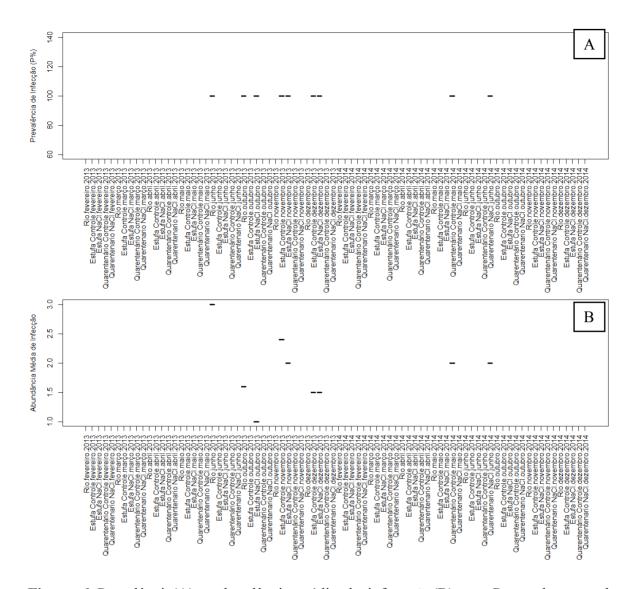


Figura 6 Prevalência(A) e abundância média de infestação(B) por *Prostenhystera obesa* parasita de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Austrodiplostomum compactum foi diagnosticado em apenas dois peixes do rio e um do ambiente *ex situ*. Peixes do rio apresentaram a maior prevalência e maior abundância média de infecção, contudo com significância estatística apenas para prevalência. No entanto, a maior intensidade média de infecção foi encontrada no peixe do ambiente *ex situ*, porém sem significância estatística (Figura 7, Tabela 3).

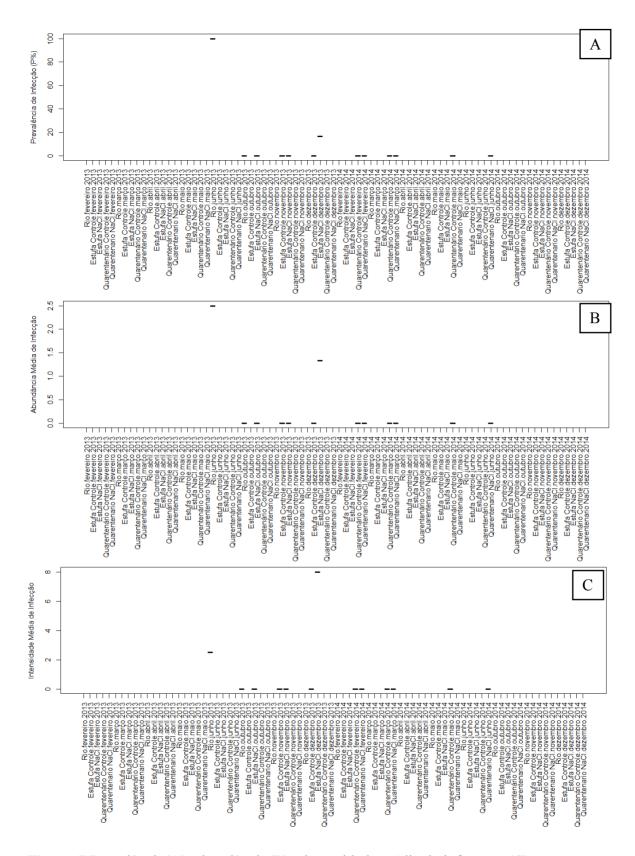


Figura 7 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média de infestação(C) por *Austrodiplostomum compactum* parasita de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Tabela 3 Teste de *Tukey** (Q) aplicado para verificar diferenças na prevalência de infestação por *Austrodiplostomum compactum* parasita de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Prevalência de Infestação						
Tratamento	Q	p-value	Período	Q	p-value	
Estufa Controle-Rio	-5.00e+01	0,04	-	-	-	
Estufa NaCl-Rio	-4.44e+01	0,04	-	-	-	
Quarentenário Controle-Rio	-5.00e+01	0,03	-	-	-	
Quarentenario NaCl-Rio	-5.00e+01	0,03	-	-	-	

^{*}Apenas valores significativos (p<0,05) são mostrados

Cucullanus sp. apresentou a maior prevalência de infecção em peixes do rio, porém sem significância estatística. Peixes de rio foram estatisticamente mais abundantemente parasitados por Cucullanus sp. do que peixes do ambiente ex situ. Contudo não houve diferença estatística para a intensidade média de infecção (Figura 8, Tabela 4).

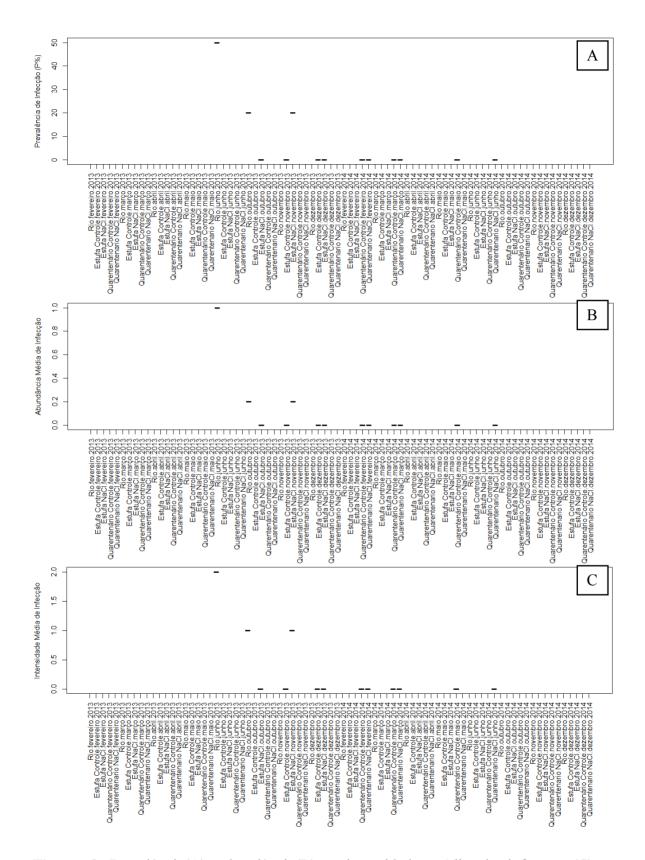


Figura 8 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média de infestação(C) por *Cucullanus* sp. parasita de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Tabela 4 Teste de *Tukey** (Q) aplicado para verificar diferenças na abundância média de infestação por *Cucullanus* sp. parasita de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Abundância Média de Infestação						
Tratamento	Q	p-value	Período	Q	p-value	
Estufa Controle-Rio	-6.00e-01	0,04	-	-	-	
Estufa NaCl-Rio	-5.33e-01	0,04	-	-	-	
Quarentenário Controle-Rio	-6.00e-01	0,03	-	-	-	
Quarentenario NaCl-Rio	-6.00e-01	0,03	-	-	-	

^{*}Apenas valores significativos (p<0,05) são mostrados

Trichodina sp. foi encontrada infestando a pele e as brânquias de *P. mangurus*, exclusivamente em ambiente *ex situ*. A prevalência e a abundância média de infestação por esse parasita na pele foi menor no quarentenário NaCl, comparado com os outros tratamentos (Figura 9, Tabela 5). De maneira similar a prevalência de *Trichodina* sp. encontrada nas brânquias foi mais alta nas estufas em novembro e dezembro e, no quarentenário controle, embora sem significância estatística. Um aumento significativo da abundância média de infestação por esse parasita nas brânquias foi observado a partir dos primeiros meses em que os peixes foram transferidos para os tanques estufa, vindo a declinar posteriormente em ambos os tratamentos do quarentenário (Figura 10, Tabela 6).

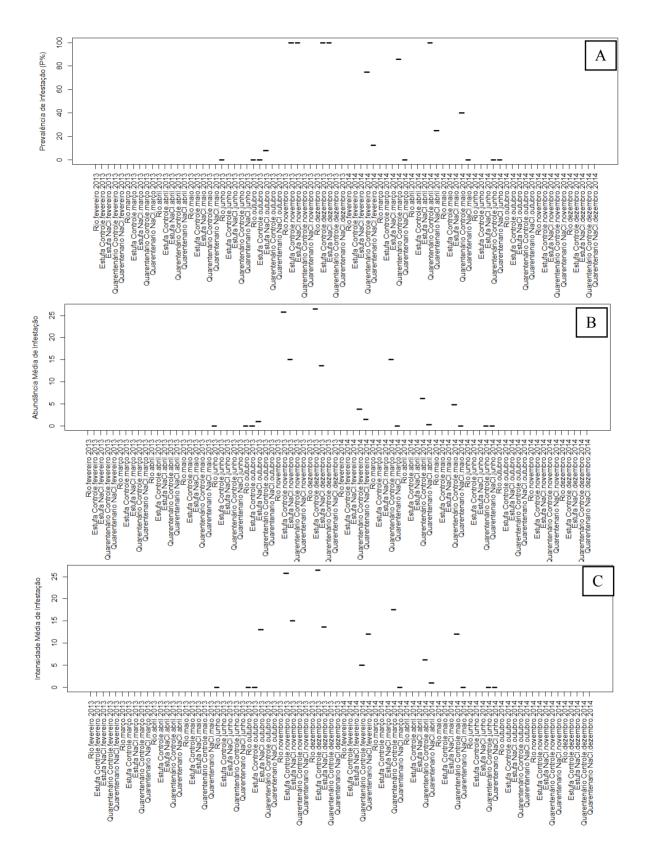


Figura 9 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média de infestação(C) por *Trichodina* sp. na pele de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Tabela 5 Teste de *Tukey** (Q) aplicado para verificar diferenças na prevalência e abundância média de infestação por *Trichodina* sp. parasita da pele de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

	Preval	ência de Info	estação		
Tratamento	Q	p-value	Período	Q	p-value
Estufa NaCl-Rio	69.23	0,04	-	-	-
Quarentenario NaCl-Estufa Controle	-59.17	0,03	-	-	-
Quarentenario NaCl-Estufa NaCl	-61.73	0,03	-	-	-
Quarentenario NaCl- Quarentenário Controle	-52.64	0,03	-	-	-
	Abundând	cia Média de	Infestação		
Ambiente ex situ	Q	p-value	Período	Q	p-value
Estufa Controle-Rio	17.43	0,03	-	-	-
Quarentenario NaCl-Estufa Controle	-17,08	0,01	-	-	-

^{*}Apenas valores significativos (p<0,05) são mostrados

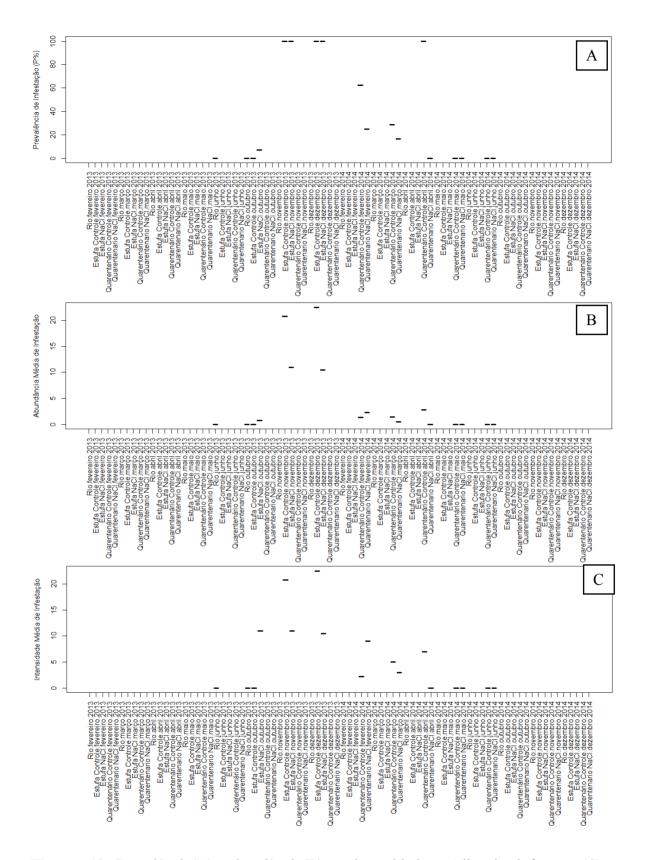


Figura 10 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média de infestação(C) por *Trichodina* sp. nas brânquias de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Tabela 6 Teste de *Tukey** (Q) aplicado para verificar diferenças na abundância média de infestação por *Trichodina* sp. parasita das brânquias de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Abundância Média de Infestação							
Tratamento	Q	p-value	Período	Q	p-value		
Estufa Controle-Rio	14,43	0,01	novembro-outubro	11,99	0,04		
Quarentenário Controle- Estufa Controle	-13,31	0,00	dezembro-outubro	12,59	0,03		
Quarentenario NaCl-Estufa Controle	-13,88	0,00	-	-	-		

^{*}Apenas valores significativos (*p*<0,05) são mostrados

Piscinoodinium pilullare foi diagnosticado exclusivamente em peixes do ambiente ex situ. Encontramos esse dinoflagelado infestando a pele e as brânquias nas fases de tomonte e trofonte. A prevalência de infestação por parasitas na fase de tomonte na pele não foi diferente nos diferentes tratamentos do ambiente ex situ. Contudo a intensidade média de infestação por esses mesmos parasitas, mostrou-se consideravelmente elevada no mês de março (Figura 11, Tabela 7). Parasitas na fase tomonte, porém encontrados nas brânquias, não diferiram sua prevalência, abundância média e nem intensidade média de infestação nos diferentes tratamentos (Figura 12). Piscinoodinium pilullare na fase trofonte encontrados na pele e nas brânquias não apresentaram diferenças estatísticas na prevalência, abundância e intensidade de infestação (Figura 13 e 14).

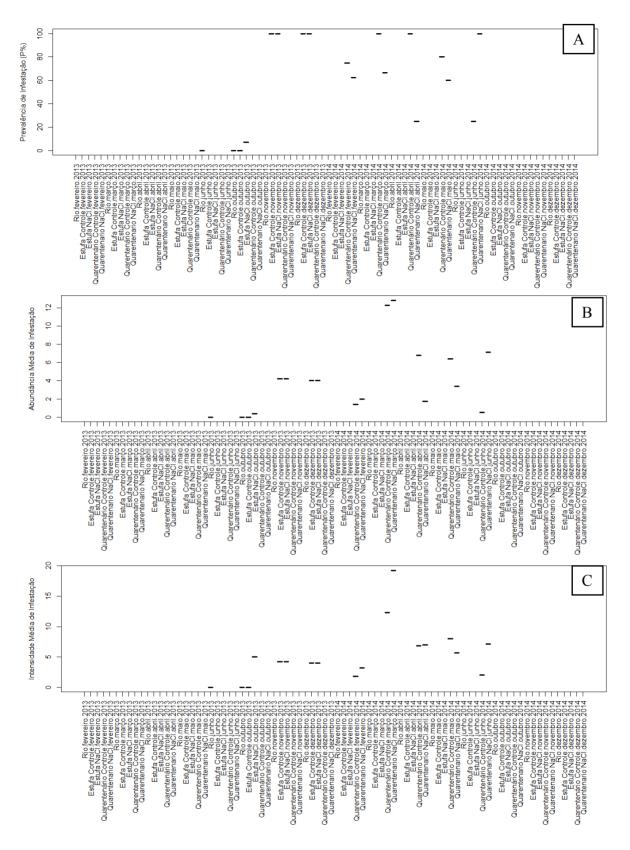


Figura 11 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média de infestação(C) por *Piscinoodinium pilullare* (tomonte) na pele de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Tabela 7 Teste de *Tukey** (Q) aplicado para verificar diferenças na intensidade média de infestação por *Piscinoodinium pilullare* (tomonte) na pele *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Intensidade Média de Infestação							
Tratamento	Q	p-value	Período	Q	p-value		
Quarentenario NaCl-Rio	8,45	0,03	março-fevereiro	13,25	0,02		
-	-	-	junho-março	-10,28	0,04		

^{*}Apenas valores significativos (p<0,05) são mostrados

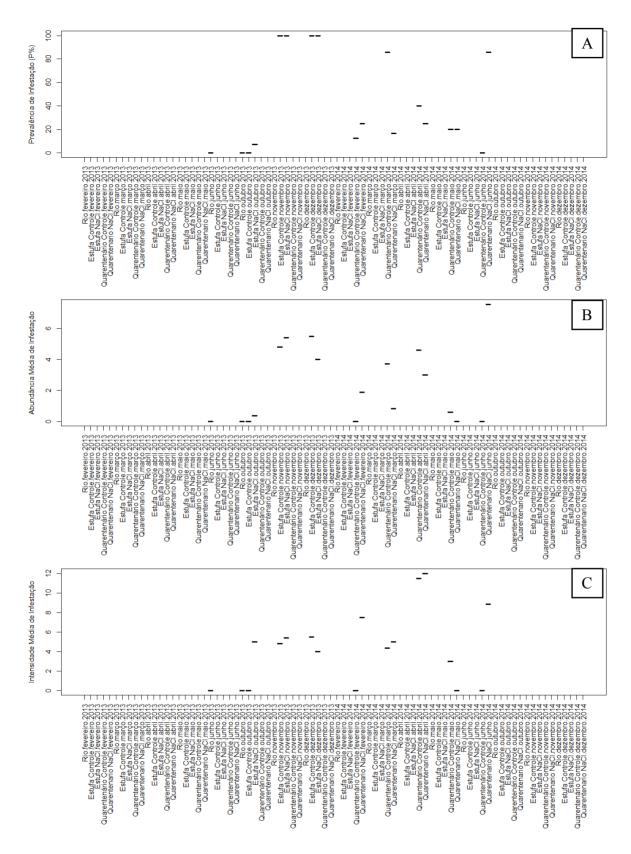


Figura 12 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média de infestação(C) por *Piscinoodinium pilullare* (tomonte) nas brânquias de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

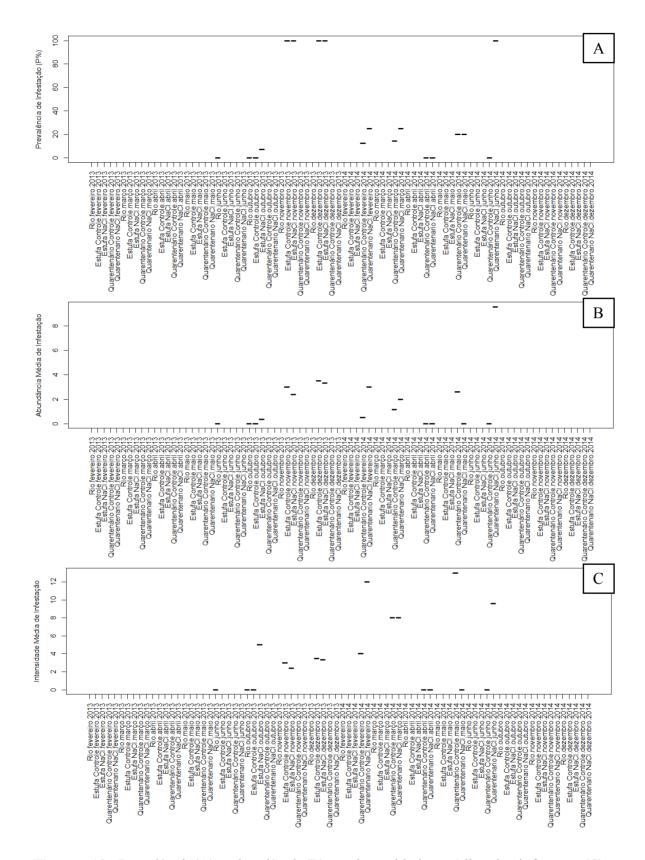


Figura 13 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média de infestação(C) por *Piscinoodinium pilullare* (trofonte) na pele de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

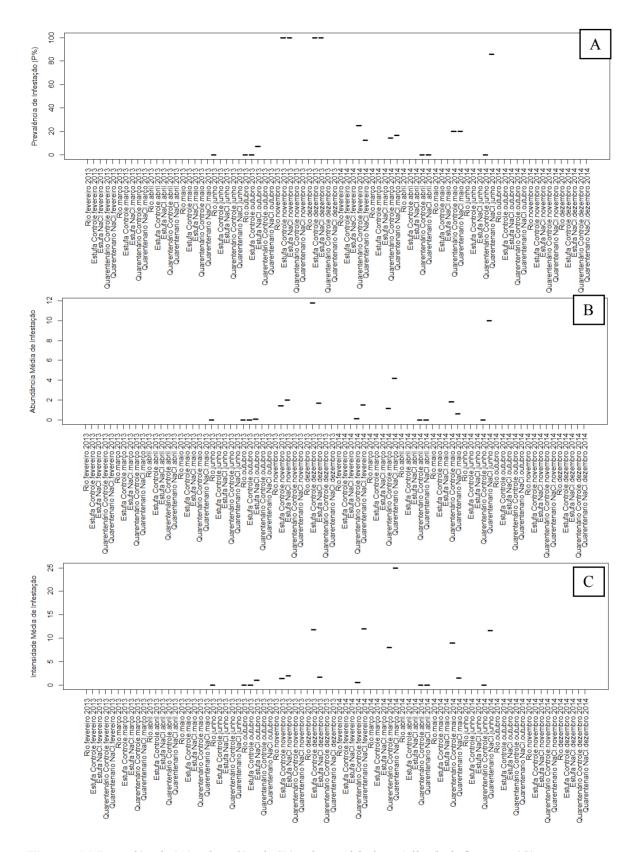


Figura 14 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média de infestação(C) por *Piscinoodinium pilullare* (trofonte) nas brânquias de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Os peixes dos diferentes tratamentos, inclusive do rio, apresentaram 100% de prevalência de infecção por *Trypanosoma* sp. E, embora tenhamos observado uma maior densidade de infecção nos peixes do quarentenário controle durante o mês de junho, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 15).

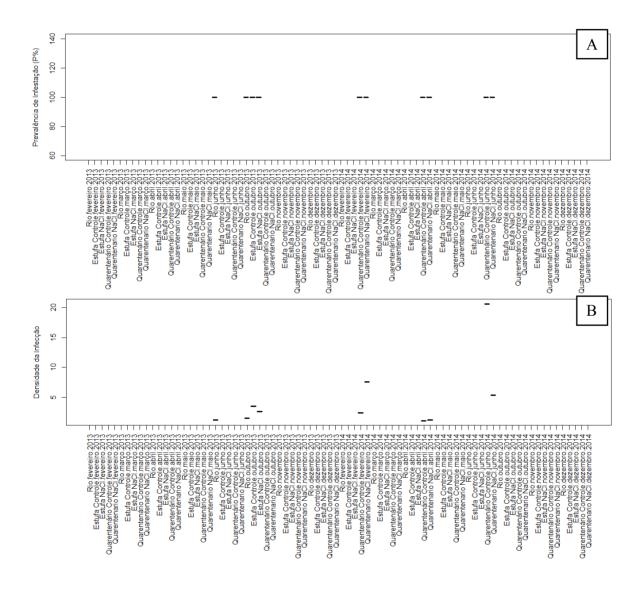


Figura 15 Prevalência(A) e densidade média de infecção(B) por Trypanosoma sp. nos sangue de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Ichthyophthirius multifiliis foi diagnosticado na pele e nas brânquias, exclusivamente em peixes do quarentenário. A prevalência e a intensidade de infestação por I. multifiliis na pele não diferiu estatisticamente nos diferentes tratamentos (Q1 e Q2). Entretanto as abundâncias parasitárias foram mais altas no mês de junho (Figura 16, Tabela 8). Os I. multifiliis diagnosticados nas brânquias não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos do quarentenário (Q1 e Q2), (Figura 17, Tabela 9).

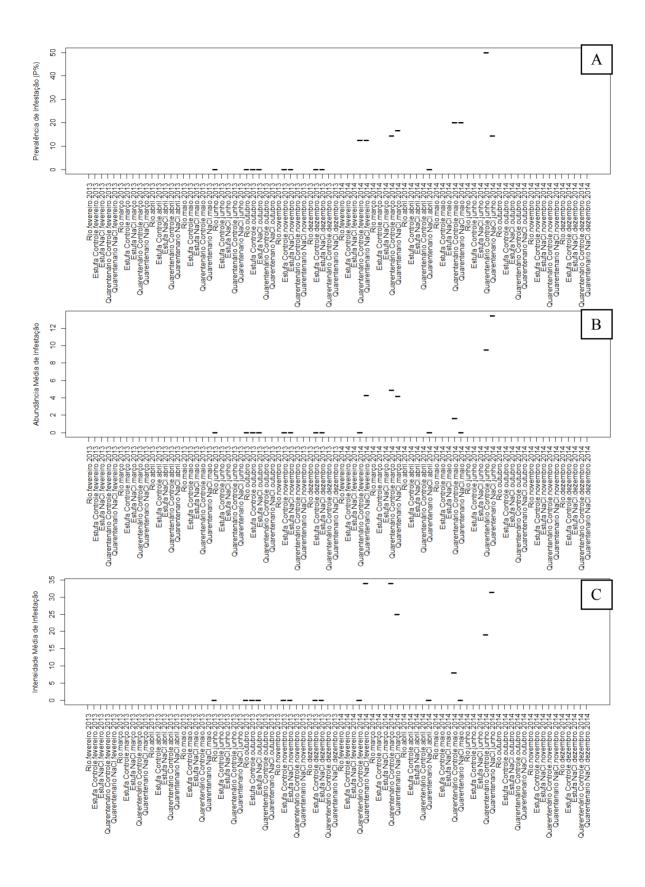


Figura 16 Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média de infestação(C) por *Ichthyophthirius multifiliis* na pele de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Tabela 8Teste de *Tukey** (Q) aplicado para verificar diferenças na abundância média de infestação por *Ichthyophthirius multifiliis* na pele de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Abundância Média de Infestação						
Tratamento	Q	p-value	Período	Q	p-value	
-	-	-	junho-abril	9,22e+00	0,04	
-	-	-	junho-maio	8.24e+00	0,03	

^{*}Apenas valores significativos (p<0,05) são mostrados

A

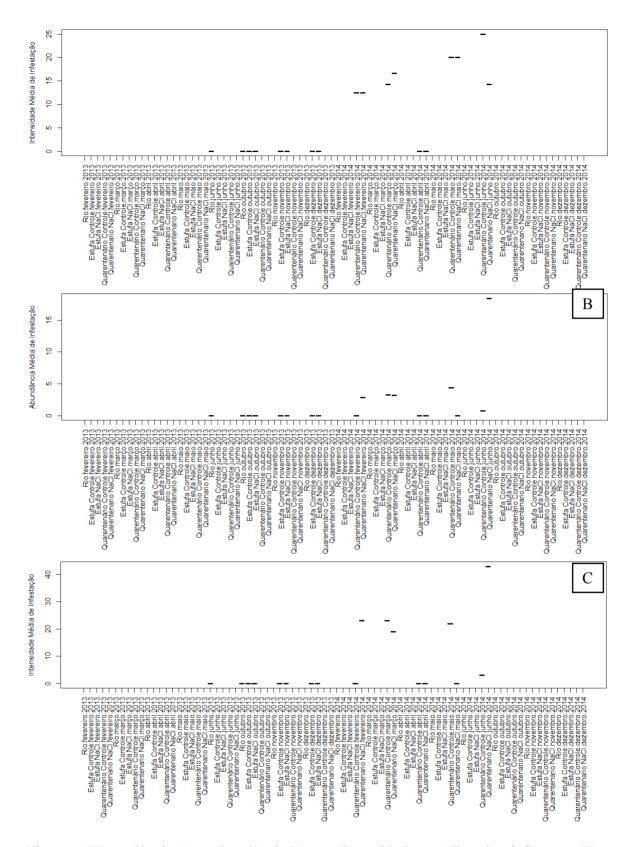


Figura 17Prevalência(A), abundância(B) e intensidade média de infestação(C) por *Ichthyophthirius multifiliis* nas brânquias de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Tabela 9 Teste de *Tukey** (Q) aplicado para verificar diferenças na prevalência de infestação por *Ichthyophthirius multifiliis* nas brânquias de *Pseudopimelodus mangurus* do rio Mogi Guaçu e em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Prevalência de Infestação						
Tratamento	Q	p-value	Período	Q	p-value	
Quarentenário Controle-Rio	1,444e+01	0,01	-	-	-	
Quarentenario NaCl-Rio	1.27e+01	0,01	-	-	-	
Quarentenário Controle- Estufa Controle	1.44e+01	0,00	-	-	-	
Quarentenario NaCl-Estufa Controle	1,27e+01	0,01	-	-	-	
Quarentenário Controle- Estufa NaCl	1,4e+01	0,00	-	-	-	
Quarentenario NaCl-Estufa NaCl	1,27e+01	0,01	-	-	-	

^{*}Apenas valores significativos (p<0,05) são mostrados

Os meses que mais morreram peixes foram novembro e dezembro, na estufa NaCl (E2) (Figura 18, Tabela 10). Contudo, quando observamos a porcentagem de peixes mortos, os diferentes tratamentos (E1, E2, Q1 e Q2) não apresentaram diferenças estatísticas. Contudo houve diferença estatística para o período de observação, revelando que junho e dezembro são os meses em que a porcetagens de peixes mortos são mais altas (Tabela 11).

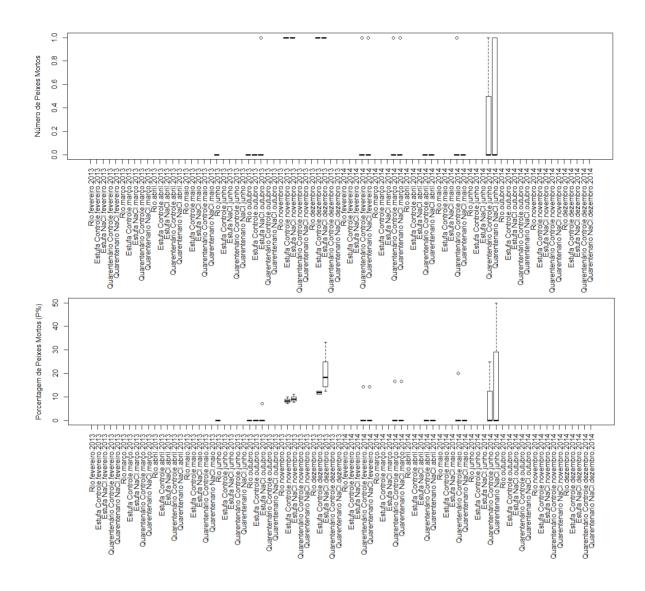


Figura 18 Número e porcentagem de *Pseudopimelodus mangurus* mortos em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

Tabela 10 Teste de *Tukey** (Q) aplicado para verificar diferenças no número de *Pseudopimelodus mangurus* mortos em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo

	Prevalência de Infestação						
Tratamento	Q	p-value	Período	Q	p-value		
Estufa NaCl-Rio	0,48	0,00	outubro-fevereiro	-0,28	0,03		
Quarentenário Controle- Estufa NaCl	-0,34	0,00	novembro-fevereiro	0,62	0,00		
Quarentenario NaCl-Estufa NaCl	-0,30	0,00	dezembro-fevereiro	0,59	0,00		
-	-	-	outubro-março	-0,31	0,02		
-	-	-	novembro-março	0,60	0,00		
-	-		dezembro-março	0,56	0,00		
-	-		novembro-abril	0,75	0,00		
-	-		dezembro-abril	0,71	0,00		
-	-		novembro-maio	0,63	0,00		
-	-		dezembro-maio	0,60	0,00		
-	-		outubro-junho	-0,49	0,00		
-	-		novembro-junho	0,42	0,01		
-	-		novembro-outubro	0,91	0,00		
-	-		dezembro-outubro	0,87	0,00		

^{*}Apenas valores significativos (p<0,05) são mostrados

Tabela 11 Teste de *Tukey** (Q) aplicado para verificar diferenças na porcentagem de *Pseudopimelodus mangurus* mortos em ambiente *ex situ*, Pirassununga, São Paulo.

Prevalência de Infestação							
Tratamento	Q	p-value	Período	Q	p-value		
-	-	-	junho-fevereiro	8,79	0.02		
-	-	-	dezembro-fevereiro	14.06	0,00		
-	-	-	dezembro-março	13.20	0,00		
-	-	-	junho-abril	10.45	0,02		
-	-	-	dezembro-abril	15,73	0,00		
-	-	-	dezembro-maio	13,51	0,00		
-	-	-	outubro-junho	-10,95	0,00		
-	-	-	novembro-outubro	7,87	0,05		
-	-	-	dezembro-outubro	16,22	0,00		

^{*}Apenas valores significativos (p<0,05) são mostrados

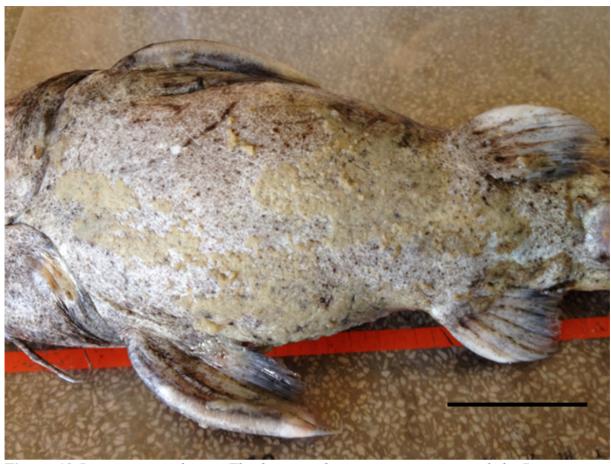


Figura 19 Lesão provocada por *Flexibacter columnaris* na parte ventral do *P. mangurus*. barra de escala = 5cmFoto : José Octávio de Lima Pereira, 2013

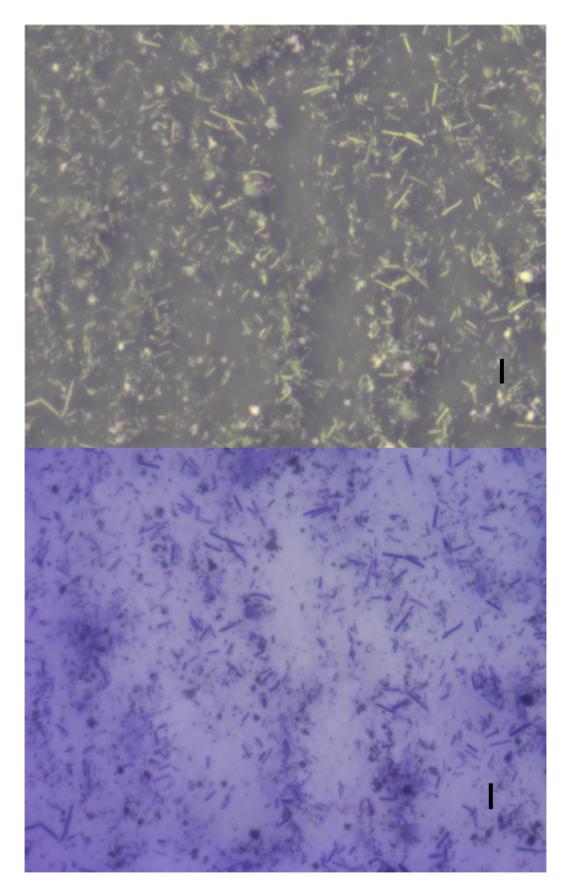


Figura 20 Flexibacter columnaris encontrada infestando Pseudopimelodus mangurus, barra de escala = 10μm Foto: José Octávio de Lima Pereira, 2013

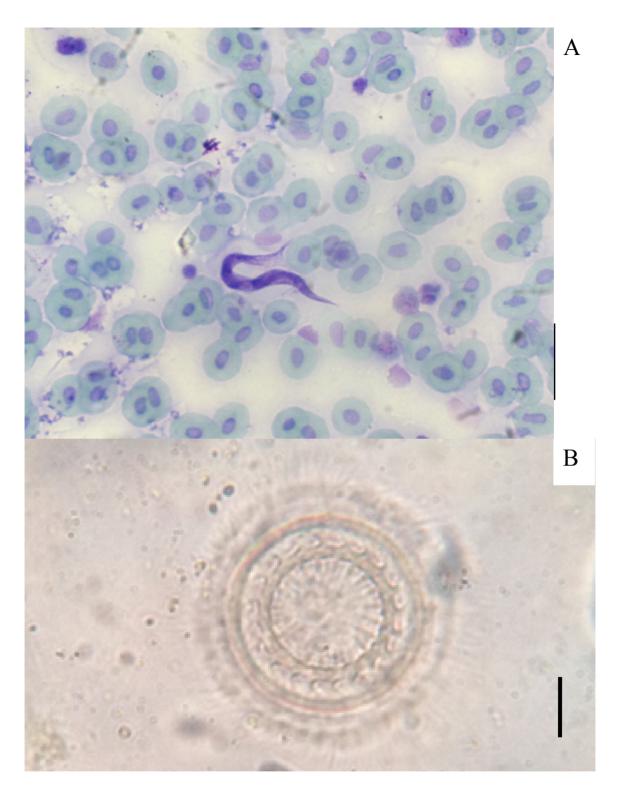


Figura 21 Protozoários encontrados em *Pseudopimelodus mangurus*. A forma de Tripomastigota de *Trypanosoma*sp. encontrada no esfregaço sanguíneo, indicado na seta, barra de escala = 20μm; B *Trichodina* sp. encontrada no raspado de pele, barra de escala = 25μm Foto: José Octávio de Lima Pereira, 2013

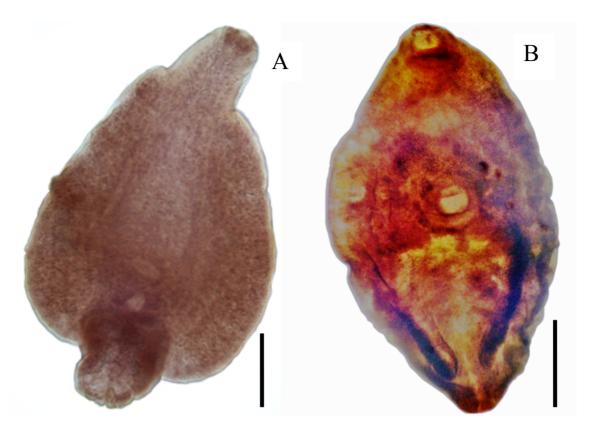


Figura 22 Digenéticos encontrados em *Pseudopimelodus mangurus*; A *Austrodiplostomum compactum* encontrada no olho de *Pseudopimelodus mangurus*,barra de escala = 200μm; B*Prostenhystera obesa* encontrado na vesícula biliar de *Pseudopimelodus mangurus*,barra de escala = 2mmFoto: José Octávio de Lima Pereira, 2013



Figura 23 *Piscinoodinium* sp. encontrado no raspado de pele de *Pseudopimelodus mangurus*, barra de escala = 30μm Foto: José Octávio de Lima Pereira, 2013

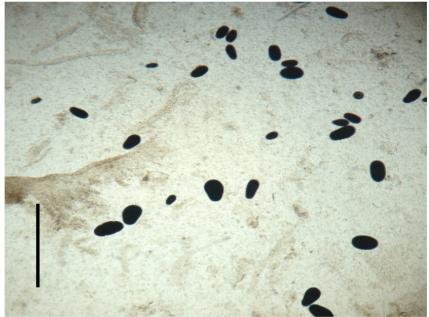


Figura 24*Piscinoodinium* sp. encontrado no raspado de pele de *Pseudopimelodus mangurus*, barra de escala = 30μm Foto: José Octávio de Lima Pereira, 2013

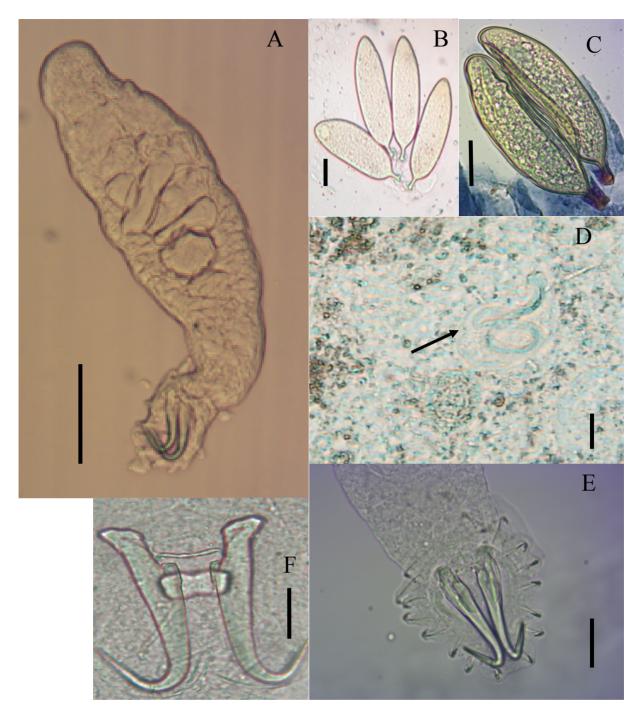


Figura 25 Gyrodactylidae *Phanerothecium* sp.; A Parasita inteiro barra de escala = 100μm; B,C ovos de *Phanerothecium* sp.barra de escala = 50μm; D órgão copulatório masculino de *Phanerothecium* sp. indicado na seta,barra de escala = 25μm; E,F haptor de *Phenerothecium* sp., barra de escala = 25μm Foto: José Octávio de Lima Pereira, 2013

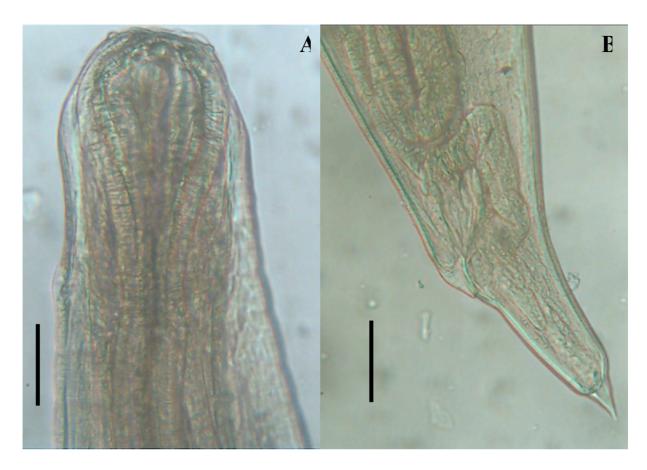


Figura 26 *Cucullanus sp.* A Região anterior da fêmea barra de escala =100μm, B Região posterior da Fêmea barra de escala = 100μmFoto: José Octávio de Lima Pereira, 2013



Figura 27*Ichthyophthririus multifillis* barra de escala = 100μmFoto: José Octávio de Lima Pereira, 2013

5 – DISCUSSÃO

Os parasitas encontrados associados a *P. mangurus* nos tanques do CEPTA, não foram os mesmos encontrados nos peixes examinados logo que coletados do rio Mogi-Guaçu, o que nos permite deduzir que os peixes tornam-se susceptíveis a outros parasitas no ambiente *ex situ*. Uma vez que a água que abastece os tanques do CEPTA é provenientes de duas represas, as quais possuem inúmeras espécies de peixes, que naturalmente estão infectados com outros tipos de parasitas, o que fez com que os mesmos se aderissem ao *P. mangurus* como um novo hospedeiro.

O encontro do Gyrodactylideo *Phanerothecium* sp. representa um novo relato de localidade e de hospedeiro. Monogenóideos dessa família, não foram relatados para o ecossistema em questão e, o registro de *Phanerothecium caballeroi*, um girodactilídeo descrito para *C. zungaro* no México, suscita dúvidas, uma vez que as cinco espécies de *Pseudopimelodus* se distribuem pela América do Sul. Espécies de *Trypanosoma* parasitas de peixes no Brasil carecem de estudos robustos de identificação, assim estudos adicionais estão sendo realizados para comprovar se nosso relato representa o *Trypanosoma zungaroi*, descrito no rio Mogi-Guaçu em *P. zungaro*. Metacercárias de *Austrodiplostomum compactum* são amplamente encontradas em peixes de água doce, contudo esse estudo denota um novo registro de localidade e de hospedeiro. A fauna parasitária de *P. magurus* do rio Mogi-Guaçu, mostrou-se relativamente rica considerando grandes grupos de parasitas, se comparada a outros siluriformes do local e, adicionalmente foram encontradas espécies potencialmente não descritas como o girodactilídeo e o hemoprotozoário *Trypanosoma* sp.. Assim, a continuidade dos estudos poderá evidenciar um número maior de espécies parasitas para este hospedeiro.

A utilização de produtos alternativos, como o sal comum (NaCl), muito empregado em banhos terapêuticos para o controle de monogenóideos em peixes (KABATA, 1985; PAVANELLI et al. 2008). De fato o tratamento com NaCl é bastante usado para combater varias enfermidade e parasitoses. Sua principal vantagem é que é um produto que se usado adequadamente não traz riscos a saúde do peixe. É comumente usado para controle da Ictiobodose, *Chilodonella*, monogenóideos e saprolegniose (PAVANELLI, *et al.* 2002). Mas com bases nos dados coletados, não observamos eficácia no emprego do sal no controle de parasitose e surtos epizooóticos. De forma semelhante ao observado nesse estudo, Vargas et al. (2003) relataram que o tratamento com sal a 3% durante 10 minutos para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) não foi eficaz na diminuição da ocorrência e nem na intensidade de ocorrência de helmintos monogenóideos.

Com a maior prevalência e abundância de infecção no rio e maior intensidade de infecção no ambiente *ex situ*, *Austrodiplostomun compactum* parece sofrer com o efeito diluidor, o qual em seu habitat natural, com maior biomassa e mais alta biodiversidade, os efeitos da parasitemia em *P. mangurus* são atenuados. Alguns autores (JOHNSON; THIELTGES, 2010; JOHNSON et al., 2012; JOHNSON et al., 2013) têm demonstrado o papel relevante que a biodiversidade enxerta na diminuição dos riscos de doenças. Isso denota a necessidade de monitorar os descritores quantitativos do parasitismo de *P. mangurus* no rio Mogi Guaçu, uma vez que esse rio sofre com os recorrentes eventos de mortandade de peixes, além de apresentar 14 espécies de peixes ameaçadas de extinção.

6 - AGRADECIMENTOS

• Agradeço ao CEPTA/ICMBio por possibilitar o desenvolvimento desse estágio.

- Aos técnicos laboratório Ricardo Afonso Torres de Oliveira e ao Arlindo Donizetti
 Lançoni por todo apoio e paciência no desenvolvimento dos trabalhos e a todo pessoal do
 CEPTA que de alguma forma contribuíram para realização de meus trabalhos.
- Ao CIEE pela concessão da bolsa, que através dessa bolsa, eu pude desenvolver melhor o meu projeto.
- Ao Programa PIBIC/ICMBio

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMATO, J.F.R.; BOEGER, W.A.; AMATO, S.B. *Protocolo para Laboratório: Coleta e Processamento de Parasitos de Pescado. Itaguaí:*Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 81p.,1991.

ARAKI, H., B. COOPER, AND M. S. BLOUIN..Geneticeffects of captive breeding cause a rapid, cumulativefitness decline in the wild. Science 318:100–103, 2007.

BOEGER, W.A. & VIANNA, R.T. Monogenoidea. In: Thatcher, V. E (Ed). Amazon Fish Parasites. 2 ed. Sofia-Moscow: Pensoft Publishers IV+508., p. 42-116, 2006.

BUSH, A.O.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, A.W. Parasitologymeetsecologyonitsownterms: Margolis et al. Revisited. Journal of Parasitology. v. 83, n. 4, p. 575–583, 1997.

COMBES, C. The art of being a parasite. Chicago, The University of Chicago, pp. 291, 2005. COHEN, S.C.; KOHN, A.; BOEGER, W.A. NeotropicalMonogenoidea. 57. Nine new species of Dactylogyridae (Monogenoidea) fromthegill of Salminusbrasiliensis (Characidae, Characiformes) from the Paraná River, State of Paraná, Brazil. Zootaxa 3049: 57–68, 2012.

CUVIER, G. & A. VALENCIENNES. Historie naturelle des poissons. Tome quinzième. Suite du livre dix-septième. Vol. 15. París. 540p., 1840.

DAVID, P. N., MELO, A. L., LINARDI, P. M., ALMEIDA VITOR, R. W. Parasitologia Humana. Biblioteca Biomédica da EditoraAtheneu, 11ª edição, 1974.

DIESING, KM. Systema Helminthum Sumptibus - Academia de Caesar e Scientiarum, Vol. I, 679 pp., 1850.

EIRAS, J.C., TAKEMOTO, R.M. & PAVANELLI, G.C. Métodos de estudo e técnicas laboratoriaisemparasitologia de peixes. 1. ed. Maringá: Eduem, 171p., 2000.

ENGELMANN, F. AND ENGLES, J.M.M. (2002) Technologies and strategies for ex-situ conservation [www document] available at: http://www2.bioversityinternational.org/publications/727/pdf/0851995225Ch9.PDF (date accessed 12/2/12).

ESCHMEYER, W.N. Catalog of Fishes. California Academy of Sciences, disponívelemhttp://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp. Acesso em maio de 2013.

FROESE, R. & PAULY, D. 2012. FishBase. World Wide Web electronic publication. Disponívelemwww.fishbase.org, versão 08/2012.

GASTON, K.J. Biodiversity, p. 27-42. In: SODHI, N.S. & P.R. EHRLICH (Ed.). ConservationBiologyforAll. New York, Oxford University, pp. 344, 2010.

GORDON, E.A; FRANCO, O.E.; TYRRELL, M.L. *Protecting biodiversity: A Guide to Criteria Used by Global Conservation Organization*. Global Institute of Sustainable Forestry Yale School of Forestry & Environmental Studies. 163pp., 2005.

IUCN (World Conservation Union). The IUCN policy statement on captive breeding. IUCN, Gland, Switzerland, 1987.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE – ICMBio.

Página oficial: Disponível em: www.icmbio.gov.br. Acesso em novembro de 2010.

JOHNSON, P. T. J. & THIELTGES D. W. Diversity, decoys and the dilution effect: how ecological communities affect disease risk. The Journal of Experimental Biology 213, 961-970, 2010.

JOHNSON et al. When parasites becomeprey: ecological and epidemiological significance of eating parasites. Trends in Ecology and Evolution. v. 1225, pp.10, 2010.

KOHN, A., FERNANDES, B.M.M. Estudo comparativo dos helmintos de peixes do rio MogiGuassu, coletadosnasexcursões realizadas entre 1927 e 1985. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 82, n. 4, p. 483–500, 1987.

KABATA, Z. Parasites and diseases of fish cultured in the tropics. Taylor & Francis, London. 318 pp., 1985.

KOHN, A, FERNANDES, BMM & BAPTISTA-FARIAS,MFD. Redescription of Prosthenhystera obesa (DIESING, 1850)(Callodistomidae, Digenea) with new hostrecords and data onmorphological variability. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 92, pp. 171-179., 1997.

KRITSKY, D.C., THATCHER, V.E. New monogenetic trematodes from freshwater fishes of western Colombia with the proposal of Anacanthoroides gen. n. (Dactylogyridae). Proceedings of the Helminthological Society of Washington. v. 43, n. 2, 129–134, 1976.

KRITSKY, D.C.; THATCHER, V. E.; BOEGER, W.A..NeotropicalMonogenea. 8. Revision of Urocleidoides (Dactylogyridae, Ancyrocephalinae), Proceedings of theHelminthologicalSociety of Washington 53 (1): 1-37. 1986

KRITSKY, D. C., & BOEGER, W. A. NeotropicalMonogenea. 16. New species of oviparousGyrodactylideawithproposal of Nothogyrodactylus gen. n.(Oogyrodactylidae). Journal of theHelminthologicalSociety of Washington, 58, 7–15., 1991.

LUNDBERG, J.G. & LITTMANN, M.W. FamilyPimelodidae (Long-whiskeredcatfishes).).

In: REIS, R.E., KULLANDER, S.O. & FERRARIS-Jr., C.J. CheckList of theFreshwaterFishes of South and Central America, EDIPUCRS, Porto Alegre, 432-446., 2003.

LUQUE, J.L., AGUIAR, J.C., VIEIRA, F.M., GIBSON, D.I. & SANTOS, C.P. Checklist of Nematodaassociatedwiththefishes of Brazil. Zootaxa, 3082: 1–88., 2011.

NEVES, R..Propagation of endangeredfreshwatermussels in North America. Journal of ConchologySpecialPublication 3: 69–80., 2004.

OOSTERHOUT, C.V.; SMITH, A.M.; HANFLING, B.; RAMNARINE, I.W.; MOHAMMED, R.S.; CABLE, J. TheGuppy as a conservation model: Implications of parasitism and inbreeding for reintroduction species. Conservation Biology 21, 1573-1583, 2007.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 2 Ed. Maringá: EDUEM: NUPÉLIA. Shepperd, G. (ed) (2008) TheEcosystemApproach: LearningfromExperience. Gland, Switzerland: IUCN., 305 p., 2002.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. Doenças de peixes:profilaxia e tratamento. EDUEM, Maringá, PR. 311 pp., 2008.

PIETER T. J. JOHNSON, DANIEL L. PRESTON, JASON T. HOVERMAN, JEREMYS. HENDERSON, SARA H. PAULL, KATHERINE L. D. RICHGELS AND MIRANDA D. REDMOND. Species diversity reduces parasite infection through crossgenerational effects on host abundance. Ecology, the Ecological Society of America, 93(1), 2012, pp. 56–64, 2012.

PIETER T. J. JOHNSON1, DANIEL L. PRESTON1, JASON T. HOVERMAN2 & KATHERINE L. D. RICHGELS. Biodiversity decreases disease through predictable changes in host community competence. Nature 230, vol. 494, 2013.

SHIBATA, O.A. FamilyPseudopimelodidae (Bumblebeecatfishes, dwarfmarbledcatfishes). In: Reis, R.E., KULLANDER, S.O. & FERRARIS-Jr., C.J. CheckList of theFreshwaterFishes of South and Central America, EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 401-405., 2003.

SCHMIDT, G.D.; ROBERTS, L.S. Foundations of parasitology. New York, The McGraw-Hill Companies, pp. 720, 2009.

SULLIVAN, M. The challenges of ex-situ orchid conservation. [www document] available at:

http://www.orchidconservationcoalition.org/pdf/articles/thechallengesofexsituorchidconservation.pdf., 2010.

THATCHER, V. E. Amazon Fish Parasites. 2 ed. Sofia-Moscow: PensoftPublishers, 2006.

TRAVASSOS, L. Contribuiçãoaoconhecimento dos helmintos dospeixes de água doce do Brasil. III. Duas novas espécies do gêneroCucullanusMüeller 1777. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 45:551–554., 1948.

VARGAS, L.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; MOREIRA, H.L.M.; ROCHA LOURES, B.T.R.; MARONEZE, M.S. Efeito do tratamento com cloreto de sódio e formalina na ocorrência de ectoparasitas em alevinos de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) revertidos sexualmente. Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia, 6: 39-48., 2003.

WOO, P.T.K. Thehaematocritcentrifugeforthedetection of trypanosomes in blood. Canadian Journal of Zoology 47, 921–923., 1969.

WOO, P.T.K. (Ed.) Fishdiseases and disorders. Oxon: CAB Internacional. V.1: Protozoan and metazoaninfections. 1995.