



Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade
Tropical
Mestrado e Doutorado
UNIFAP / EMBRAPA-AP / IEPA / CI-Brasil



WAGNER AMANAJÁS CARDOSO

PARASITOS DO FILO APICOMPLEXA EM *Hoplias aimara*
(Valenciennes, 1847) DE VIDA LIVRE DA AMAZÔNIA ORIENTAL

MACAPÁ, AP

2021

WAGNER AMANAJÁS CARDOSO

PARASITOS DO FILO APICOMPLEXA EM *Hoplias aimara* (Valenciennes,
1847) DE VIDA LIVRE DA AMAZÔNIA ORIENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biodiversidade Tropical
(PPGBIO) da Universidade Federal do Amapá,
como requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Biodiversidade Tropical.

Orientador: Dr. Lúcio André Viana Dias

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Jamile da Conceição da Silva – CRB-2/1010

Cardoso, Wagner Amanajás.

Parasitos do filo apicomplexa em *Hoplias aimara* (Valenciennes, 1847) de vida livre da Amazônia oriental. / Wagner Amanajás Cardoso; Orientador, Lúcio André Viana Dias. – Macapá, 2020.
30 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical.

1. Peixes - Parasito 2. Trairão (Peixe) – Amazônia. 3. Apicomplexa. 4. Protozoários. 5. Análise filogenética. 6. Morfologia. I. Dias, Lúcio André Viana, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

597.098116 C268p
CDD. 22 ed.

WAGNER AMANAJÁS CARDOSO

PARASITOS DO FILO APICOMPLEXA EM *Hoplias aimara* (Valenciennes,
1847) DE VIDA LIVRE DA AMAZÔNIA ORIENTAL

Lúcio André Viana Dias
Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)

Marcos Tavares Dias
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Marcela Videira
Universidade Estadual do Amapá (UEAP)

Aprovada em 31 de agosto de 2021, Macapá, AP, Brasil.

Dedico este trabalho aos meus pais, minha esposa
e ao meu filho que sempre me apoiaram
incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Lúcio Viana por todos esses anos de troca de experiências, pelas vezes nas quais me recebeu em sua casa e apontou as possibilidades de leitura, abordagem e caminhos. Não acho que apenas algumas palavras possam expressar minha gratidão por sua orientação e motivação. Obrigada por tudo e por ser um verdadeiro pai científico.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e não mediram esforços para que eu corresse atrás dos meus sonhos. Tudo isso não seria possível se não fossem vocês.

A minha esposa e ao meu filho por toda dedicação, esforço, carinho e compreensão para que este e outros projetos de minha vida se façam possíveis. Obrigado por fazerem parte da minha jornada.

A todos os amigos, pelos momentos de diversão, pelos abraços e palavras de encorajamento que sempre me deram forças para seguir em frente, especialmente ao Alex Boeteger. Obrigada pela participação que têm na minha vida.

Aos meus caros companheiros de orientação: Fabiane de Paula, Glauciele da Silva, Jamille Correa e Paulo Meija. Valeram toda a troca de conhecimento e experiência, os encontros e discussões para amenizar as angústias.

A todos os colaboradores, funcionários e colegas do curso, que proporcionaram a realização deste sonho.

As Instituições, Autarquias e Fundações de Fomento a Educação e Pesquisa e de Manejo e Conservação dos Recursos Naturais: CEUA-UNIFAP, SISBIO E SISGEN, pelo apoio e concessão das documentações necessárias.

RESUMO

Cardoso, Wagner Amanajás. Parasitos do Filo Apicomplexa em *Hoplias aimara* (Valenciennes, 1847) de vida livre da Amazônia Oriental: caracterização morfológica e molecular. Dissertação (Mestre em Biodiversidade Tropical) – Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Tropical – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - Universidade Federal do Amapá.

O Filo Apicomplexa compreende uma vasta gama de parasitos com algumas espécies de interesse médico e médico veterinário. Apesar de sua grande importância pouco se sabe sobre sua ocorrência em animais silvestres, sobretudo em peixes, menos ainda sobre a sua importância ecológica e evolutiva e sobre aspectos relacionados à sua biodiversidade e relações filogenéticas. Dessa forma, utilizando análise morfológica e molecular concentramos esforços para identificar a presença de hemogregarinas e de coccídios extra-intestinais em trairões, *Hoplias aimara* (Valenciennes, 1847), no Rio Fausino estado do Amapá, Brasil. Caracteres morfológicos, morfométricos e filogenéticos baseados em sequências parciais do gene 18S rRNA foram utilizados para identificar esses organismos. No capítulo 1 parasitos do gênero *Hepatozoon* foram encontrados na forma de cistos com cistozoítos no fígado de *Hoplias aimara* (Valenciennes, 1847) não foi observado outros estágios sanguíneos no peixe. Os achados comprovam a circulação destes parasitos nestes vertebrados, que provavelmente comportam-se como hospedeiros paratênicos no ambiente natural. Os resultados da análise filogenética baseada em um fragmento do gene 18S rRNA sugere a ocorrência de uma potencial nova espécie de *Hepatozoon*, filogeneticamente relacionada a *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909).

Palavras-chave: Apicomplexa; Análise Filogenética; Morfologia; Protozoários; Trairões; Vida Livre.

ABSTRACT

Cardoso, Wagner Amanajás. Parasites of the Phylum Apicomplexa in free-living *Hoplias Aymara* (Valenciennes, 1847) from the Eastern Amazon: morphological and molecular characterization. Dissertation (Master's in Tropical Biodiversity) – Graduate Program in Tropical Biodiversity – Dean of Research and Graduate Studies – Federal University of Amapá.

The Apicomplexa Phylum comprises a wide range of parasites with some species displaying medical and veterinary interest. Despite its paramount importance, little is known about its occurrence in wild animals, especially fish, and even less about its ecological and evolutionary importance and aspects associated to its biodiversity and phylogenetic relationships. Thus, we concentrated efforts to identify the presence of hemogregarins and extra-intestinal coccidia in “trairões”, *Hoplias aimara* (Valenciennes, 1847), on the Fausino River state of Amapá, Brazil. Employing morphological and molecular analyses. Morphological, morphometric and phylogenetic characters based on partial 18S rRNA gene sequences were used to identify these organisms. In chapter 1, parasites belonging to the *Hepatozoon* genus detected in the form of cysts containing cystozoites in the liver of *Hoplias aimara* (Valenciennes, 1847) no other blood stages were observed in the fish. The findings confirm the circulation of these parasites in these vertebrates, which probably behave as paratenic hosts in the natural environment. The results of the phylogenetic analysis based on an 18S rRNA gene fragment suggest the occurrence of a potential new *Hepatozoon* species, phylogenetically related to *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909).

Keywords: Apicomplexa, Phylogenetic Analysis, Morphology, Protozoa, Trairões, Free-living.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	10
1.1. FILO APICOMPLEXA (LEVINE, 1970).....	10
1.2. CICLO DE VIDA DOS APICOMPLEXA (LEVINE, 1970).....	13
1.3. SISTEMÁTICA E TAXONOMIA DO FILO APICOMPLEXA	14
2. PRINCIPAIS PARASITOS DO FILO APICOMPLEXA EM PEIXES E OUTROS VERTEBRADOS.....	15
3. FAMÍLIA HEPATIZOZOIDAE WENYON, 1926.....	18
3.1 <i>Hepatozoon</i> (MILLER, 1908)	18
3.2 Ciclo de vida de <i>Hepatozoon</i>	21
3.3 <i>Hepatozoon</i> em Peixes.....	23
4. FAMÍLIA ERYTHRINIDAE VALENCIENNES, 1847.....	24
4.1 Aspectos Gerais Sobre <i>Hoplías</i>	25
4.2 <i>Hoplías aimara</i> (VALENCIENNES, 1847).....	27
5. HIPÓTESES.....	30
6. OBJETIVOS.....	31
6.1 GERAL.....	31
6.2 ESPECÍFICO.....	31
7. REFERÊNCIAS.....	32
8. CAPÍTULO 1.....	43
<i>Hepatozoon</i> PARASITES (APICOMPLEXA: HEPATIZOZOIDAE) IN FISHES <i>Hoplías aimara</i> (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) FROM THE EASTERN AMAZON, BRAZIL.	
9. CONCLUSÕES.....	58

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Filo Apicomplexa (Levine, 1970)

O filo Apicomplexa abriga cerca de 4600 espécies, no entanto esse número pode ser mais de dez vezes maior. Estes protozoários estão divididos em mais de 300 gêneros com mais de 60 famílias (Levine 2018).

O Filo Apicomplexa merece destaque por apresentar patógenos de interesse médico e médico veterinário, além da vasta gama de hospedeiros que infectam e elevado impacto associado. Por exemplo, *Plasmodium* spp. agente causador da malária, *Cryptosporidium* spp. causador de diarreias graves em animais imunocomprometidos, *Eimeria* spp., responsável pela coccidiose em aves, e *Besnoitia* sp., *Babesia bovis* e *Theileria* spp., parasitos de gado, dentre outros com impactos na economia e saúde pública (Perkins et al. 2000, De Souza et al. 2010).

As famílias Haemogregarinidae e Calyptosporidae por serem frequentes em peixes motivarão este trabalho, no entanto, registrou-se apenas formas de cistos com cistozoitos de *Hepatozoon* sp. em fígado de Trairões (*Hoplias aimara* Valenciennes 1847). Assim segue uma breve exposição da taxonomia do filo Apicomplexa, destacando as semelhanças e diferenças dos parasitos do gênero *Hepatozoon* e outros grupos do filo Apicomplexa, em relação aos diferentes estágios parasitários e dos agentes envolvidos nos seus ciclos de vida. A caracterização taxonômica do filo Apicomplexa segue a revisão de Adl et al. (2005).

As maiorias dos Apicomplexos importantes se enquadram em cinco grupos principais: (1) os das gregarinas, parasitos de invertebrados, com cerca de 1600 espécies, 225 gêneros e 40 famílias; (2) os hemogregarinos, encontrados nas células do sangue de peixes, répteis e outros vertebrados, com cerca de 400 espécies, quatro gêneros e uma família; (3) os coccídios, encontrados no homem e os animais domésticos, dentre eles aves, gado, ovelhas, cabras,

porcos, cães, gatos, roedores e peixes e também em alguns invertebrados, com cerca de 2.000 espécies, 65 gêneros e 22 famílias; (4) os hemósporos, compostos de parasitas sanguíneos, com cerca de 450 espécies, 10 gêneros e uma família; (5) e os piroplasmas, importantes para a pecuária, com cerca de 170 espécies, seis gêneros em três famílias (Levine 2018).

O sucesso evolutivo do filo devem-se ao conjunto de organelas especializadas característica da parte apical dos estágios invasivos (esporozoítos e merozoítos) e pela presença de um pequeno conjunto de organelas discretas no citoplasma de todos os estágios de desenvolvimento, com ênfase para os microtúbulos arranjos, anel polar e corpos secretores (Fig. 1), os quais mediam a entrada do parasita na célula hospedeira (Fig. 2), onde geralmente sobrevivem dentro de um vacúolo parasitóforo (Votýpka et al. 2017).

Ecologicamente, os parasitos desse filo podem influenciar nos processos biológicos de seus hospedeiros, tais como a seleção sexual (Ehman e Scott 2002, Megía-Palma et al. 2018) e a dinâmica de predação e competição (Schall 1992, Garcia-Longoria et al. 2015). Apesar disso, a maioria dos esforços para compreensão do táxon concentra-se em espécies que causam doenças em aves e mamíferos. Em animais silvestres, sobretudo em peixes, o conhecimento sobre esses parasitos ainda é limitado, restringindo-se apenas a identificação de algumas espécies, principalmente de *Eimeria* e *Goussia* (Whipps et al. 2012).

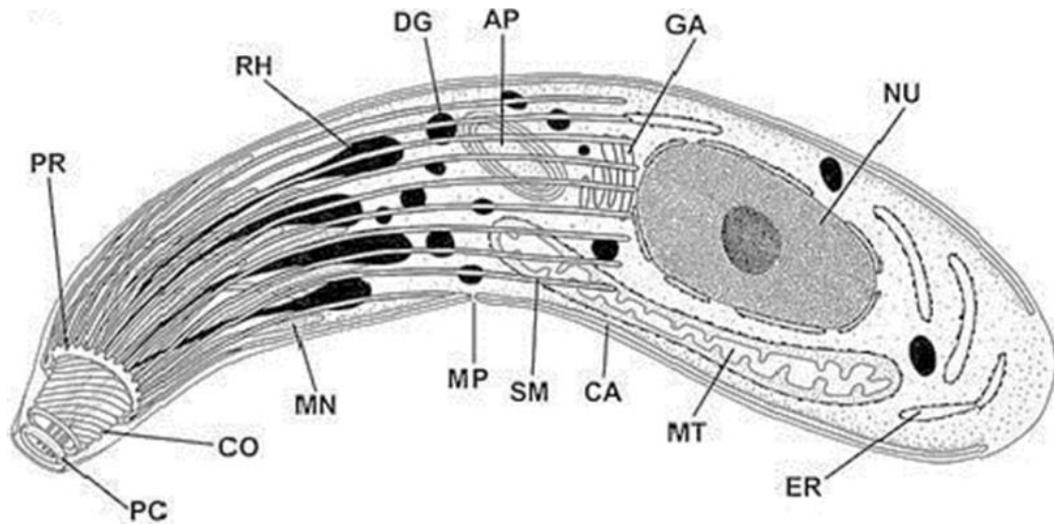


Figura 1 - Estrutura de um esporozoíto ou merozoíto típico. Apicoplasto (AP), alvéolos corticais (CA), conóide (CO), grânulos densos (DG), retículo endoplasmático (ER), aparelho de Golgi (GA), micronemes (MN), microporo (MP), mitocôndria (MT), núcleo (NU), anéis pré-conoidais (PC), anel polar (PR), roptrias (RH), microtúbulos subpeliculares (SM). Fonte: Votýpka et al. 2017.

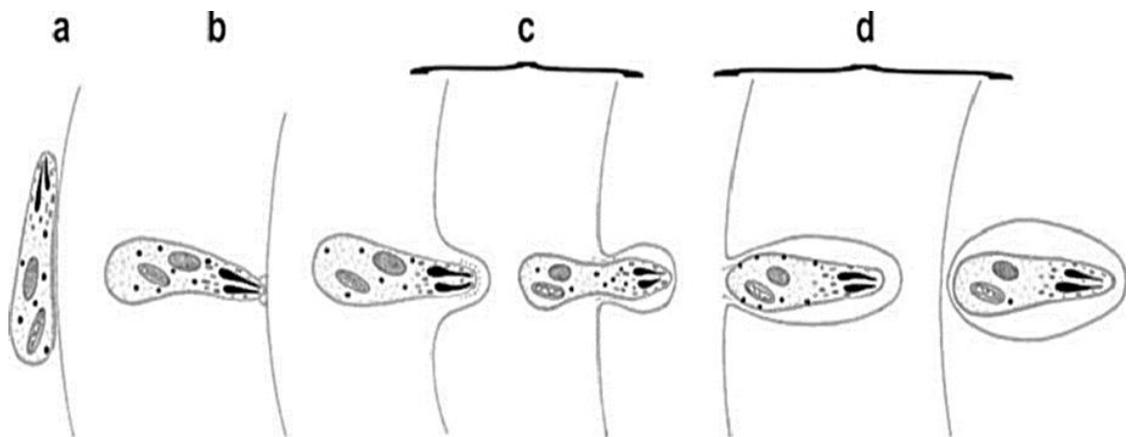


Figura 2 - Invasão do esporozoíto em uma célula hospedeira. Contato primário da esporozoíto sem orientação (a); apego seguido pela reorientação apical (b); indução do parasitóforo vacúolo (c); translocação do esporozoíto no vacúolo dos órgãos excretores. Fonte: Votýpka et al. 2017.

1.2. Ciclo de vida dos Apicomplexa (Levine, 1970)

De acordo com Levine (1980), todos os membros do Filo Apicomplexa são parasitos com ciclos de vida complexos, apresentando duas fases assexuadas, conhecidas como merogonia e esporogonia, e uma sexuada, chamada de gametogonia, com os ciclos de vida envolvendo um ou mais hospedeiros, caracterizados por monoxênicos e heteroxênicos, respectivamente.

O ciclo de vida dos Apicomplexos alterna entre assexual e sexual com desenvolvimento em um ou mais hospedeiros vertebrados ou invertebrados, pouco se sabe sobre a sua indução, tempo de ocorrência e sobre os mecanismos moleculares de diferenciação de um estágio do ciclo de vida para o outro (Smith e Ranford-Cartwright 2002).

O número de estágios infecciosos (esporozoítos, merozoítos ou gametócitos) depende do meio de transmissão usado por cada espécie e a mudança do desenvolvimento assexuado para o sexual, em um dos hospedeiros, necessita da formação de gametócitos. Esses estágios são transmissíveis para hospedeiros definitivos invertebrados, no caso dos hemoparasitos, ou precedem imediatamente aos estágios que levam à formação de oocistos, para os coccídeos intestinais e extra-intestinais. (Smith e Ranford-Cartwright 2002).

Os Apicomplexos são os únicos entre os eucariotos que o gametócito masculino se diferencia em um ou mais microgametas (gametogênese) e fertiliza um macrogameta, ou gameta feminino, produzindo um zigoto, este por sua vez, diferencia-se em um oocisto com múltiplos esporozoítos (esporogonia) (Fig. 3), os quais compreendem formas alongadas e geralmente infectantes que se liberam ou não dos oocistos, dependendo do grupo de parasitos (Siddall 1995).

Na célula hospedeira, os esporozoítos se dividem assexuadamente de uma a três vezes (merogonia primária e secundária), gerando várias células filhas chamadas merozoítos. Estes

se diferenciam posteriormente em gametócitos (gametogonia), que são os precursores da fase sexual. Este padrão se altera em diferentes grupos e alguns não possuem certas fases (Siddal 1995).

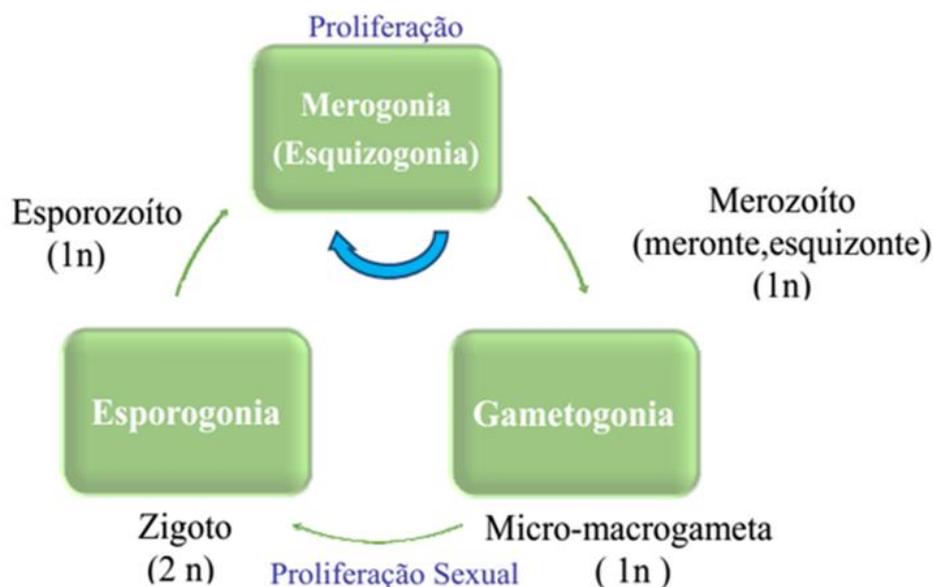


Figura 3 - Desenho esquemático de um ciclo de vida típico dos coccídios e hemosporídeos do Filo Apicomplexa. Adaptado de Votýpka et al. 2017.

1.3. Sistemática e taxonomia do Filo Apicomplexa

A classificação dos Apicomplexa compreende cinco grupos principais: gregarinas, hemogregarinas, coccídios, hemosporídeos (parasitas maláricos) e piroplasmas, tradicionalmente agrupados em quatro classes (Adl et al. 2012, Votýpka et al. 2017).

De acordo com Morrison (2008), a maioria dos agrupamentos foram formados com base em caracteres morfológicos dos parasitos e no tipo de hospedeiro vertebrado e vetor, além da predileção pelo tecido do parasitado. Nos últimos anos, com o emprego de abordagens moleculares, o grupo tem passado por diversas reclassificações taxonômicas, no entanto, as questões filogenéticas ainda são pouco esclarecidas para o Filo (Adl et al. 2012; Barta et al. 2012).

Neste estudo será abordado o esquema taxonômico proposto por Adl et al. (2005) (Tabela 1) para a classificação de alguns dos parasitos do Filo Apicomplexa observados em peixes e outros vertebrados.

Tabela 1 - Classificação do Filo Apicomplexa.

Filo **Apicomplexa** Levine, 1970 emend. Adl et al., 2005
Subfilo **Conoidasida** Levine, 1988
Classe **Coccidia** Leuckart, 1879
Ordem **Eucoccidiorida** Léger and Duboscq, 1910
Subordem **Adeleorina** Léger, 1911
Família **Haemogregarinidae** Léger, 1911
Gênero *Haemogregarina* Danilewsky, 1885
Gênero *Cyrtia* Lainson, 1981
Gênero *Desseria* Siddall, 1995
Família **Hepatozoidae** Wenyon, 1926
Gênero *Hepatozoon* Miller, 1908
Subordem **Eimeriorina** Léger, 1911
Família **Calyptosporidae** Overstreet, Hawkins & Fournie, 1984
Gênero *Calyptospora* Overstreet, Hawkins & Fournie, 1984

Adaptado de Votýpka et al. 2017

2. Principais Parasitos do Filo Apicomplexa em Peixes e Outros Vertebrados.

Os principais grupos de parasitos do Filo Apicomplexa que ocorrem em peixes são as Hemogregarinas (Subordem: Adeleorina Léger, 1911; Família: Haemogregarinidae Léger,

1911) e o coccídio extra-intestinal (Subordem: Eimeriorina Léger, 1911; Família: Calyptosporidae Overstreet, Hawkins e Fournie, 1984).

A subordem Adeleina (Léger, 1911), apresenta um conjunto de macro e microgametas no interior da célula hospedeira, fenômeno denominado sizígia, o microgamonte produz de um a quatro microgametas, a endodiogenia é ausente e os esporozoitos encontram-se envolvidos em uma membrana fina e frágil dentro do oocisto (esporocistos) (Dias 2010). A subordem Eimeriina (Léger, 1911) se diferencia da Adeleina pelo desenvolvimento independente dos gametas, de tal forma que não se observa a fase de sizígia e o microgamonte produz muitos microgametas, assim como os esporozoitos são envolvidos por um esporocisto no interior do oocisto (Dias 2010).

O termo haemogregarina é utilizado para agrupar parasitos vermiformes e largos encontrados em leucócitos e eritrócitos (Davis 2000).

As hemogregarinas são agrupadas em quatro famílias: (1) Haemogregarinidae (Léger, 1911), contendo *Haemogregarina* (Danilewsky, 1885), *Cyrilia* (Lainson, 1981) e *Desseria* (Siddall, 1995); (2) Hepatozoidae (Wenyon, 1926) com *Hepatozoon* (Miller, 1908); (3) Karyolysidae (Wenyon 1926) com *Karyolysus* (Labbé, 1894) e *Hemolivia* (Petit, Landau, Baccam & Lainson, 1990); (4) Dactylosomatidae (Jakowska e Nigrelli, 1955) com *Dactylosoma* (Labbé, 1894) e *Babesiosoma* (Jakowska & Nigrelli, 1956) (O'Donoghue 2017).

Siddall (1995) sugeriu que apenas hemogregarinas que infectam quelônios (Reptilia, Testudines) podem ser consideradas como Haemogregarina sensu stricto, enquanto que as de peixes seriam classificadas como *Desseria* ou *Cyrilia*, ou ainda como Haemogregarina sensu lato (Davies & Smit, 2001). Para outros hospedeiros vertebrados, tais como crocodilianos, lagartos, serpentes, anfíbios, aves e mamíferos esses parasitos foram reportados como

Hepatozoon dependendo da determinação de seus vetores e estudos sobre ciclos de vida (O'Donoghue 2017).

Calyptosporidae foi proposta com intuito de abrigar os gêneros *Calyptospora* e *Goussia*, distinguindo-os da família Eimeriidae, devido ao fato de apresentarem um ciclo de vida heterógeno com um hospedeiro intermediário invertebrado. Estes coccídios são parasitos do tecido e órgãos de peixes, com predileção por tecidos hepáticos, e invertebrados aquáticos (Overstreet et al. 1984).

No Brasil, os registros existentes de hemogregarinas em peixes são: *Desseria mugili* (Carini, 1932) em tainhas (*Mugil liza* Cuvier e Valenciennes, 1836); *Haemogregarina platessae* (Lebailly, 1905) em linguado (*Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839); e *Cyrilia lignieresii* (Lainson, 1981) em muçum (*Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795) (Siddall 1995, Davies et al. 2000, Eiras et al. 2012); e *Cyrilia* sp. em espécies de arraias (*Potamotrygon* cf. *histris*) e (*Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa e Araújo, 2016) (Magro et al. 2013). Recentemente, a espécie *Haemogregarina daviesensis* sp. nov. foi isolada a partir de *Lepidosiren paradoxa* (Fitzinger, 1837) no leste da Amazônia, tendo como base o uso combinado de dados morfológicos, morfométricos e genéticos para sua descrição (Esteves-Silva et al. 2019).

Atualmente são conhecidas três espécies de *Calyptospora* que infectam peixes nos sistemas de água doce no Brasil: (i) *Calyptospora serrasalmi* (Cheung, Nigrelli & Ruggieri, 1986) em piranhas negras (*Serrasalmus nigers* Cheung et al., 1986); (ii) *Calyptospora tucunarensis* (Békési & Molnár, 1991) em tucunaré (*Cichla ocellaris* Schneider, 1801); e (iii) *Calyptospora spinosa* (Azevedo et al., 1993) em jacundá (*Crenicichla lepidota* Heckel, 1840) (Békési et al. 1991; Azevedo et al. 1993; De-Albuquerque et al. 2010; Ramos et al. 2018).

Bonar et al. (2006), relataram a presença de esporozoítos com morfologia consistente para o gênero *Calyptospora* sp., em pirarucus juvenis (*Arapaima gigas* Schinz, 1822), importados do Brasil para os Estados Unidos.

Albuquerque e Brasil-Sato (2010), registraram *Calyptospora* sp. no fígado e intestinos da piaba-facão (*Triportheus guentheri* Garman, 1890) e no intestino da piaba (*Tetragonopterus chalceusi* Spix e Agassiz, 1829), assim como, Silva et al. (2012), relataram o agente em piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii* Valenciennes, 1940). Recentemente a espécie *Calyptospora paranaidji* (Da Silva et al., 2019) foi descrita em *Cichla piquiti* (Kullander e Ferreira, 2006) oriundos do Rio Tocantins, na fronteira entre os estados do Maranhão e Tocantins (Silva et al. 2019).

3. Família Hepatozoidae (Wenyon, 1926)

3.1. Hepatozoon (Miller, 1908)

A classificação taxonômica do gênero *Hepatozoon* se manteve incerta por muitos anos, em grande parte por falta de informações acerca do desenvolvimento esporogônico dos protozoários desse gênero. Até recentemente, devido à similaridade dos gamontes intraeritrocitários de *Haemogregarina* spp., *Karyolysus* spp. e *Hepatozoon* spp., estes parasitos, junto com os demais, estavam agrupados numa única família Haemogregarinidae. No entanto, a considerável diversidade biológica exibida nos seus hospedeiros definitivos (vetores) justificou a separação em famílias distintas, dentro do filo Apicomplexa, tal fato contribuiu para Wenyon (1926) remover o gênero de Haemogregarinidae criando assim a família Hepatozoidae (Barta 2000, Davies & Johnston 2000).

O critério mais aceito para a diferenciação entre o gênero *Haemogregarina* e *Hepatozoon* é o desenvolvimento esporogônico nos vetores invertebrados (Desser 1993). Em

Haemogregarina os oocistos são menores e apresentam cerca de oito esporozoítos, enquanto que em *Hepatozoon*, os oocistos são maiores e abrigam centenas de esporozoítos.

O gênero *Hepatozoon* é um dos mais importantes do filo Apicomplexa sendo descrito em todos os grupos de vertebrados tetrápodes (Smith 1996). Desde a sua descrição original no roedor, a lista de hospedeiros vertebrados para *Hepatozoon* foi estendido para incluir aves (Hoare 1924), outras espécies de mamíferos (Wenyon 1926), crocodilianos (Hoare 1932), lagartos (Robin 1936), cobras (Ball et al. 1967), quelônios (Michel 1973) e anuros (Desser et al. 1995). *Hepatozoon* apresenta especial predileção por serpentes, onde se observa uma quantidade maior de espécies do gênero (Smith 1996, Maia et al. 2016, Hrazdilová et al. 2021, Zechmeisterová et al. 2021).

O gênero *Hepatozoon* inclui 46 espécies de mamíferos, 19 de aves, 42 de anuros, 121 de serpentes, 74 de lagartos, uma de salamandra e seis de crocodilianos (Smith 1996).

Uma grande variedade de invertebrados também foi mostrada como vetores e hospedeiros definitivos de *Hepatozoon*, incluindo carrapatos, ácaros, percevejos reduvídeos, dípteros (Telford 1984), piolhos (Clark et al. 1973), pulgas (Krampitz 1982, Bennett e Penzhorn 1992), e talvez sanguessugas (Smith 1996, Pessôa e Cavalheiro 1969ab).

Hepatozoon spp. são, aparentemente, bem adaptados, causando pouca ou nenhuma patologia a seus hospedeiros naturais (Telford, 1984). Apesar destes parasitos serem considerados bem adaptados, em serpentes, infecções com altas parasitemias, podem ocasionar quadros de anemia hemolítica (Mader 1996). Em hospedeiros não naturais, essa infecção tem potencial de causar doenças inflamatórias clinicamente significativas, dentre elas: hepatite necrotizante, pancreatite e esplenite (Wosniak e Telford, 1991, Wosniak et al., 1996).

As espécies de *Hepatozoon*, por um período superior a 20 anos, foram descritas com base nas análises morfológicas e morfométricas dos gamontes encontrados no sangue periférico dos hospedeiros vertebrados (Smith 1996; Sloboda et al. 2007). No entanto, o uso da morfologia pode ser limitado, uma vez que dependem dos estágios de vida e das características do parasito que podem ser indistinguíveis (Siddall 1995; Telford 2009; Harris et al. 2011; Perkins et al. 2011; Oliveira et al. 2018).

Estudos antigos consideravam que o gênero apresentava alta especificidade, de tal forma que a presença de *Hepatozoon* sp. em um determinado hospedeiro poderia ser fator determinante para descrição de novas espécies, independentemente de terem sido observados em outros hospedeiros (Smith 1996, Sloboda et al. 2007).

O uso de técnicas moleculares, nos últimos 15 anos, revolucionou a taxonomia do grupo (Sloboda et al. 2007). No entanto, dependendo da escolha do marcador molecular, alguns agrupamentos podem ser sustentados ou não e ainda gerar estimativas errôneas de árvores filogenéticas mesmo que suportadas (Perkins et al. 2011). Assim, a taxonomia com o uso combinado de informações morfológicas e moleculares tem se tornado uma prática comum na sistemática atual, ajudando a desvendar lacunas existentes e a esclarecer as relações filogenéticas dos parasitos do filo e de outros grupos taxonômicos, permitindo a descrição de dezenas de novas espécies de *Hepatozoon* (Ujvari et al. 2004; Morrison 2008; Perkins et al. 2011; Maia et al. 2016; Hrazdilová et al. 2021; Zechmeisterová et al. 2021).

O gene ribossomal 18S (rRNA) continua a ser o marcador mais usado nas análises filogenéticas das hemogregarinas e se mostra eficaz na descrição de *Hepatozoon* (Ûngari et al. 2018; Hrazdilová et al. 2021).

3.2. Ciclo de vida de *Hepatozoon*

O gênero *Hepatozoon* apresenta ciclo de vida heteróxico, caracterizado pela participação de invertebrados hematófagos como vetores e hospedeiros definitivos, e de um ou mais vertebrados como hospedeiros intermediários (Smith 1996; Votýpka et al. 2017).

O ciclo reprodutivo, do tipo gametogênese, ocorre no intestino ou hemocele de um hospedeiro definitivo artrópode hematófago, seu desenvolvimento esporogônico produz esporozoítos que são transmitidos aos hospedeiros intermediários vertebrados pela picada de um vetor artrópode, este se conclui com a formação de oocistos polisporocísticos, ao passo que o desenvolvimento do tipo merogônico ocorre nos órgãos internos dos hospedeiros vertebrados após a ingestão de artrópodes infectados (Smith 1996; Mathew et al. 2000).

Quando o ciclo biológico envolve mais de um hospedeiro intermediário, os quais atuam como hospedeiros paratênicos, formas infectantes quiescentes denominadas cistozoítos, são comumente relatadas em anuros, lagartos e serpentes, o hospedeiro intermediário vertebrado se torna infectado quando ingere os cistozoítos presentes no hospedeiro paratênico (Smith 1996; Paperna et al. 2004; Viana et al. 2012; Pereira et al. 2013).

Várias espécies de hepatozoídeos apresentam formas císticas monozoicas ou dizóicas (cistozoítos) em répteis, anuros e mamíferos (Johnson et al. 2008). A presença de estágios císticos aumenta a complexidade do ciclo de vida e explora o comportamento alimentar de hospedeiros vertebrados predadores (Smith 1996).

Nas espécies de *Hepatozoon* os esporozoítos são liberados no trato intestinal dos vertebrados que os ingeriram, podendo invadir órgãos como pulmão, baço e fígado, dando início a fase assexuada (merogonia). Os merozoítos ao abandonarem as células das vísceras penetram nos eritrócitos e leucócitos, transformando-se em gametócitos, em seguida são ingeridos pelo hospedeiro invertebrado, diferenciando-se em macro e microgametócitos, em

seguida os gametas se associam em sizígia formando o zigoto que se desenvolve em oocisto na parede externa do intestino ou na hemocele do vetor. Dentro do oocisto ocorre a esporogonia com a formação de centenas de esporozoítos. O ciclo se completa quando o vetor infectado com esporozoítos é ingerido pelo hospedeiro vertebrado (Fig. 4) (Desser 1993).

Em hospedeiros invertebrados (ácaros, carrapatos, insetos, possivelmente sanguessugas) podemos observar microgametas aflagelados, uniflagelados ou biflagelados; esporogonia; sem esporocinetes; oocistos grandes, com numerosos esporocistos, cada um com quatro a 16 ou mais esporozoítos, geralmente na hemocele daqueles hospedeiros (Davies & Johnston2000).

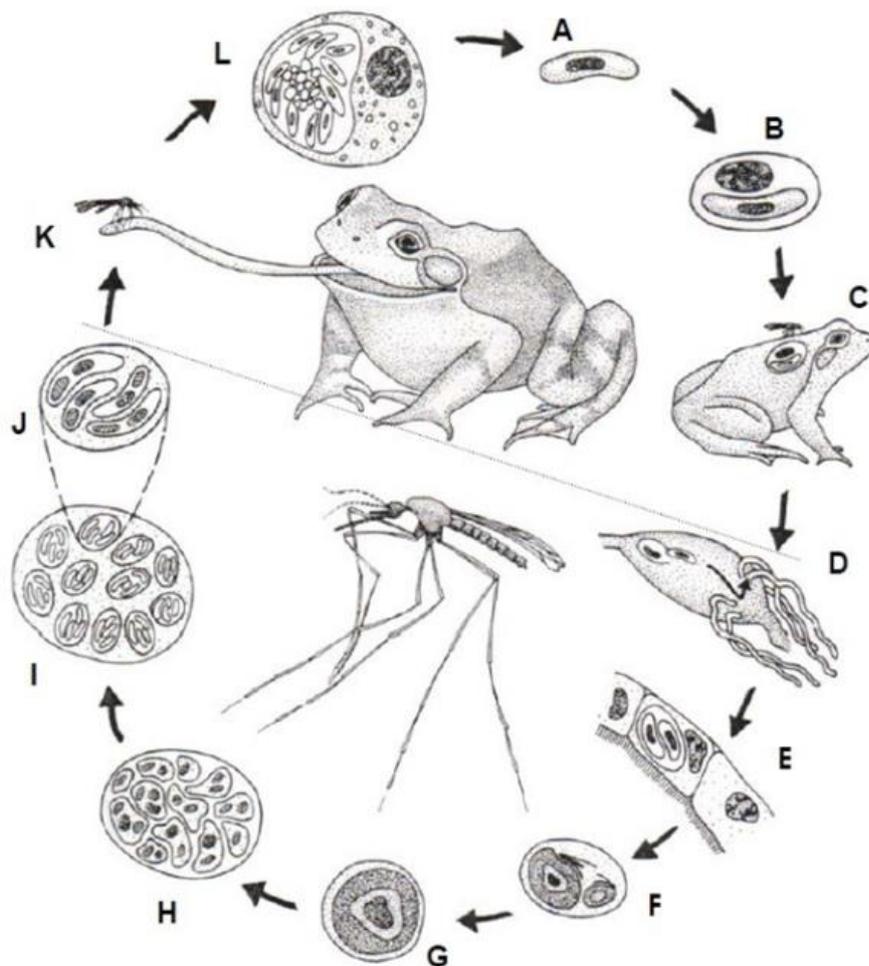


Figura 4 - Ciclo de vida do *Hepatozoon catesbiana* no anuro *Rana catesbiana* e no mosquito *Culex territans*. **A.** Merontes localizados no fígado dão origem a merozoítos que penetram nos eritrócitos. **B.**

Merozoítos transformam-se em gametócitos nos eritrócitos. **C.** Mosquitos ingerem gametócitos. **D.** Gametócitos saem dos eritrócitos no estômago dos mosquitos e penetram nos túbulos de Malpighi. **E.** Micro e macrogametócitos se juntam nas células dos túbulos de Malpighi. **F.** Formação de dois microgametas biflagelados, um dos quais fecunda o macrogameta. **G.** O zigoto se expande formando oocistos esféricos dentro dos tubos de Malpighi. **H.** Oocisto se segmenta formando vários esporoblastos. **I.** Esporoblastos se transformam em esporocistos. **J.** Esporocisto com quatro esporozoítos. **K.** Sapos são infectados quando ingerem mosquitos contendo esporozoítos. **L.** Esporozoítos entram nas células do parênquima hepático e se desenvolvem em merontes. Figura adaptada de Dessler et al. 1995.

3.3. *Hepatozoon* em Peixes

Apesar da falta de conhecimento da fase esporogônica para muitas das espécies de *Hepatozoon*, as quais permanecem caracterizadas por formas de gametócitos nas células sanguíneas nos hospedeiros vertebrados, assim como o pouco conhecimento sobre os ciclos e as formas de muitas espécies, mesmo as ainda consideradas válidas, o gênero, até a presente data, foi proposto para abrigar espécies registradas em diversos hospedeiros exceto peixes (Smith 1996).

Embora a presença de cistos contendo *Hepatozoon* spp. seja provavelmente frequente na natureza, com registros da ocorrência para cães (Baneth e Shkap 2003), roedores (Dessler 1990; Laakkonen et al. 2001; Johnson et al. 2008; De Castro-Demoner et al. 2019), anuros (Viana et al. 2012) e répteis (Lainson et al. 2003; Paperna e Lainson 2004), nenhum relato dessas formas em peixes foi observado até o momento. Embora em peixes não tenha sido registrado formas císticas de hepatozooídeos, em condições experimentais Pereira et al. (2014) e Vianna et al. (2012), registraram cistos com cistozoítos em *Metynnis* sp. (pacu) alimentados individualmente com fêmeas de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823) previamente ingurgitadas (21-23 dias) com sangue de jacarés infectados com *Hepatozoon caimani* (Carini,

1909). Assim, este estudo tem como objetivo registrar a ocorrência de cistos com cistozoítos de *Hepatozoon* sp. em peixes *H. Aimara*, capturados no Rio Fausino na Amazônia Oriental, através de caracterização morfológica, morfométrica, molecular e filogenética.

4. Família Erythrinidae (Valenciennes, 1847)

Erythrinidae (Teleostei: Characiformes) é uma pequena família de peixes neotropicais de água doce, endêmica das Américas Central e do Sul. Estes peixes podem ser encontrados em córregos, rios de diferentes tamanhos, lagos, reservatórios e regiões de cachoeira, nesses ambientes apresentam comportamento sedentário e de emboscada, utilizados para predarem outros peixes (Oyakawa, 2003; Oyakawa & Mattox, 2009).

Ao contrário dos grandes peixes migratórios neotropicais, eles geralmente não são capazes de superar obstáculos como cachoeiras e grandes corredeiras (Oyakawa, 2003). No entanto, alguns respiram fora da água podendo se deslocar de um lago para outro em terra (Prado et al. 2006). As espécies do grupo realizam fertilização externa, construção de ninhos e guarda de ovos, geralmente por machos (Prado et al. 2006).

Atualmente, essa família consiste em 18 espécies distribuídas em três gêneros: *Erythrinus* (Scopoli, 1777) (n = 2 espécies), *Hoplerythrinus* (Gill, 1895) (n = 3 espécies) e *Hoplias* (Gill, 1903) (n = 13 espécies) (Oyakawa 2003, Sember et al. 2018). *Erythrinus* é composto por *Erythrinus erythrinus* (Bloch & Schneider, 1801) e *Erythrinus kessleri* (Steindachner, 1877). *Hoplerythrinus* inclui: *Hoplerythrinus cinereus* (Gill, 1858), *Hoplerythrinus gronovii* (Valenciennes, 1847) e *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Spix & Agassiz, 1829) (Froese e Pauly 2014). *Hoplias* é o gênero mais difundido na América do Sul, composto por dois grandes grupos: *Hoplias lacerdae* (Miranda Ribeiro 1908) e *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), o primeiro grupo contendo seis espécies e o segundo é um caso clássico de espécies crípticas relacionadas a aspectos cromossômicos (Gemi et al. 2014).

O número de espécimes do grupo *H. lacerdae* em coleções ictiológicas muito aumentou nas últimas décadas, refletindo uma expansão de sua distribuição geográfica conhecida em toda a América do Sul (Oyakawa 2003, Mattox et al. 2006).

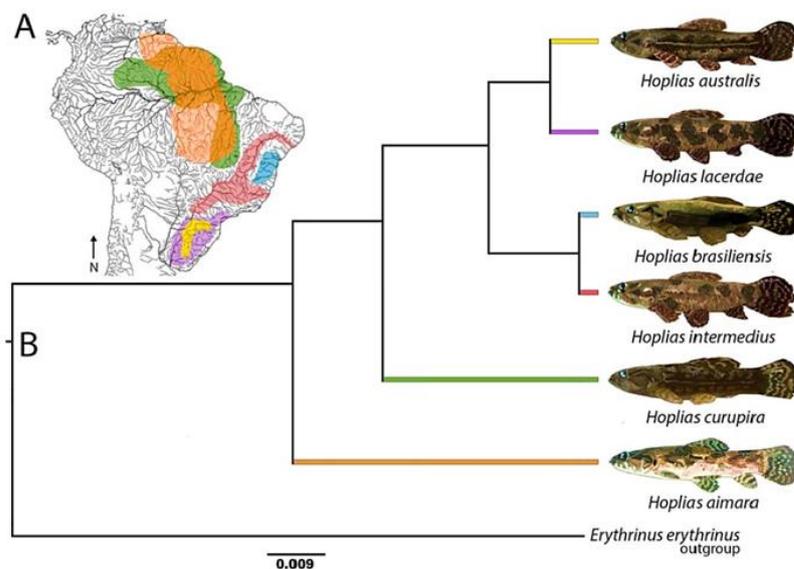
4.1. Aspectos gerais sobre *Hoplias* (Gill, 1903)

Representantes de *Hoplias* são distribuídos em muitos sistemas hidrográficos da América do Sul, sendo popularmente conhecidos como “traíras”, “trairões” ou “lobos” (Oyakawa et al. 2009).

O gênero *Hoplias* pode ser distinguido dentre os characiformes pela presença de: (1) contato entre o vômer e o parassenoide por meio de interdigitações; (2) um mesetemoide com uma projeção anterior que separa os pré-maxilares contralaterais; (3) o contato das partes anteriores de infraorbitais 2 e 5 com exclusão de infraorbitais 3 e 4 do rebordo orbital; (4) a extremidade posterior da maxila com grande projeção ao longo de sua margem dorsal; (5) a expansão da região mediana da coluna hemal da quinta vértebra; e (6) a ausência do processo ventral da terceira vértebra (Oyakawa 1998).

Hoplias lacerdae originalmente foi definido como um conjunto de espécies de traíras de grande porte, em oposição a traíras de menor porte que foram agrupadas como *H. malabaricus* (Oyakawa et al. 2009).

As traíras gigantes (*H. lacerdae*) são agrupadas em cinco espécies (Fig. 5) reconhecidas com base em seus aspectos merísticos e morfológicos, compreendidos por *Hoplias australis* (Oyakawa & Mattox, 2009), *Hoplias brasiliensis* (Spix & Agassiz, 1829), *Hoplias curupira* (Oyakawa & Mattox, 2009), *Hoplias intermedius* (Günther, 1864) e *Hoplias lacerdae* (Miranda Ribeiro, 1908) (Sassi et al. 2021).



Fonte: Sassi et al. 2021

Figura 5 - Relações filogenéticas de traíras gigantes e sua distribuição na América do Sul. (A) Mapa de distribuição de espécies gigantes de *Hoplias* (grupo *H. lacerdae* + *H. aimara*). Cada cor representa uma espécie, como segue: amarelo, *Hoplias australis*; roxo, *H. lacerdae*; azul, *H. brasiliensis*; vermelho, *H. intermedius*; verde, *H. curupira*; laranja, *H. aimara*.

Muitas espécies são importantes na pesca de subsistência e comercial em várias regiões do Brasil e outros países da América do Sul (Goulding 1980). *Hoplias lacerdae* possui características desejáveis para a pesca esportiva (Andrade et al. 1998) e notável potencial para a aquicultura. Apresenta hábito alimentar carnívoro, preferencialmente ictiófago (Maciel et al. 2009).

Pompeu e Godinho (2001), ao analisarem o conteúdo estomacal de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) constataram a presença de peixes, ninfas de Odonata e camarões. Entre os peixes ingeridos, foram identificadas oito espécies: *Lycengraulis* sp.; *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758); *Oligosarcus solitarius* (Menezes, 1987); *H. Malabaricus* (Bloch, 1874); *Leporinus steindachneri* (Eigenmann, 1907); *Cyphocharax gilbert* (Quoy e Gaimard, 1824) e *Crenicichla lacustris* (Castelnau, 1855).

Em estudo sobre a dieta de *H. aimara* na Guiana Francesa foi observada variação ontogenética nos itens consumidos: enquanto nos indivíduos adultos verificou-se predomínio de consumo de peixes, assim como o consumo ocasional de anuros, caranguejos, iguanas e aves, nos indivíduos juvenis foram registrados espécimes de Decapoda e outros invertebrados (Horeau et al. 1998).

A dieta dos trairões à base de peixes de pequeno porte, insetos e camarões, pelo menos em uma fase do seu ciclo de vida, podem contribuir para a ocorrência de parasitos do Filo Apicomplexa nesses hospedeiros intermediários.

O traíção é um predador por excelência, que ataca uma variedade de peixes, criando condições favoráveis para a permanência e disseminação de parasitos no meio ambiente aquático (Barros et al. 2007, Montenegro et al. 2013).

Eiras et al. (2012), levantaram a ocorrência de *Trypanosoma limae* em trairões (*H. lacerdae*), como também a presença de *Apiosoma* sp., *Calyptospora* sp., *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina* sp., *Trypanosoma macrodonis*, *Trypanosoma salae* e *Trypanosoma* sp. em traíras (*H. malabaricus*).

4.2. *Hoplias aimara* (Valenciennes, 1847)

Hoplias aimara é um peixe teleósteo predador da América do Sul (Meunier et al. 2015) que ocorrem em ambientes lóticos, como pequenos a grandes rios e cachoeiras, até águas estritamente lênticas, como lagos e reservatórios (Oyakawa & Mattox, 2009).

Indivíduos de *H. aimara* foram descritos no Brasil nos Rios Tocantins, Xingu, Tapajós, Jarí e Trombetas, nas drenagens costeiras das Guianas, Suriname e no estado Amapá, Brasil, e também nas partes baixas do Rio Orinoco na Venezuela (Taphorn 1992, Planquette et al. 1996, Mattox et al. 2006, Moreira et al. 2015).

H. aimara pode atingir tamanho considerável, até um metro de comprimento (Oyakawa & Mattox 2009), distinguindo-se das congêneres pela presença de uma mancha escura alongada verticalmente na porção mediana da membrana opercular e pelo tamanho relativamente grande do olho (Fig. 6) e pela ausência do ectopterigóide acessório (Fig. 7) (Mattox et al. 2006).

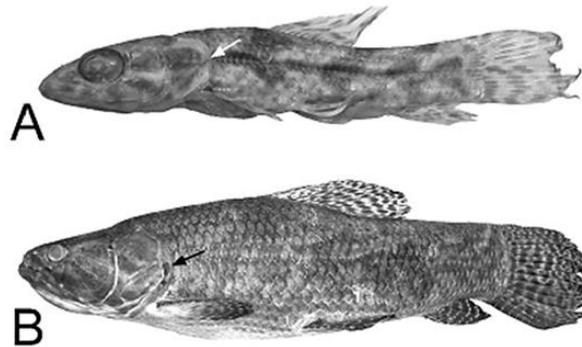


Figura 6 - *Hoplias aimara*: (A) FMNH 109458, 46,9 mm SL; (B) MZUSP 87964, 355,3 mm SL. Flecha indica mancha escura verticalmente alongada na membrana opercular. Oyakawa & Mattox 2009

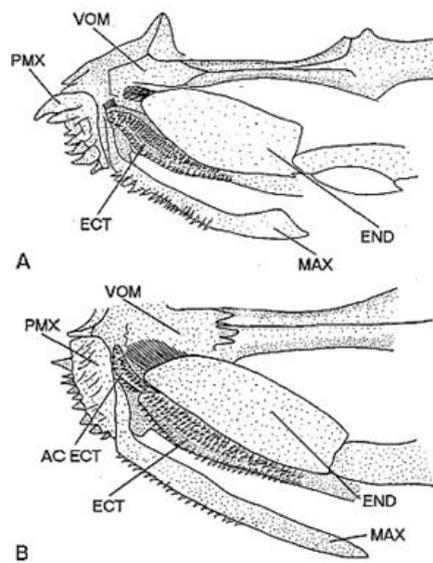


Figura 7 - Vista ventral da porção anterior direita do crânio e suspensório de (A) *Hoplias aimara*, MZUSP 41513, 107,4 mm SL e (B) *H. malabaricus*, MZUSP 47720, 146,8 mm SL. Abreviaturas: AC ECT, ectopterigóide acessório; ECT, ectopterigóide; END, endopterigóide; MAX, maxila; PMX, pré-maxila; VOM, vômer. Oyakawa & Mattox 2009

As margens mediais dos dentários contralaterais em *H. aimara* convergem gradualmente em direção à sínfise mandibular, resultando em margens em forma de “U” na vista ventral (Figura 8 A), distinguindo-se das outras espécies de *Hoplias* que têm as margens mediais de dentários contralaterais convergindo mais abruptamente, em direção à sínfise mandibular, resultando nas margens em “V” na vista ventral (Figura 8 B).

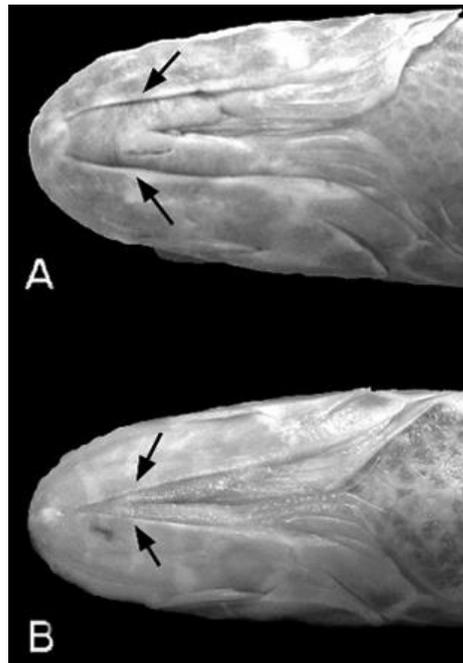


Figura 8 - Vista ventral da cabeça de (A) *Hoplias aimara*, MZUSP 21835, 136,3 mm SL e (B) *H. malabaricus*, AMNH 74691, 167,2 mm SL. Oyakawa & Mattox 2009

Referências à cerca da importância ecológica de *H. aimara* são escassas ou inexistentes, a maioria das publicações refletem outras espécies do gênero. *H. malabaricus*, possui um importante papel ecológico na manutenção de comunidades de outras espécies de

peixes, de tal forma que em lagoas onde estes peixes foram excluídos, são significativamente mais percebidas as reduções em riquezas de outras espécies (Beliene et al. 2014).

O trairão apresentar carne de excelente qualidade, características desejáveis à pesca esportiva e bons resultados de crescimento quando em cultivo semi-intensivo, tais características vêm despertando interesse entre produtores e pesquisadores em várias regiões brasileiras (Luz et al. 2000).

De acordo com Whipps et al. (2012), existem numerosas espécies de parasitos do Filo Apicomplexa que infectam peixes e que possuem características morfológicas únicas que fornecem informações sobre a evolução deste importante grupo. Contudo, o conhecimento sobre a biodiversidade destes agentes em peixes ainda é relativamente muito limitado, assim como, a sua história evolutiva e suas relações filogenéticas, uma vez que existem relativamente poucos dados moleculares disponíveis para esses organismos.

Portanto, considerando o enorme potencial econômico, social e ambiental de *H. aimara*, popularmente conhecido como trairão, investigou-se a presença dos parasitos do Filo Apicomplexa mediante caracterização morfológica e molecular, com intuito de contribuir com informações relevantes para conservação de exemplares de vida livre.

5. HIPÓTESES

- Serão encontrados parasitos do gênero *Haemogregarina* na circulação sanguínea de *Hoplias aimara*, de rios do estuário amapaense;
- Serão encontrados *Hepatozoon* sp. no fígado de *H. aimara*, de rios do estuário amapaense;

6. OBJETIVOS

6.1. GERAL

- Descrever através da taxonomia integrativa microparasitos sanguíneos e *Hepatozoon* em *Hoplias aimara* do Rio Fausino, na Amazônia Oriental.

6.2. ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização morfológica, morfométrica e molecular de parasitos sanguíneos e *Hepatozoon* em *H. aimara*;
- Determinar as relações filogenéticas de parasitos sanguíneos e *Hepatozoon* em *H. aimara*;

REFERÊNCIAS

- Adl, S. M., A. G. Simpson, C. E. Lane, J. Lukeš, D. Bass, S. S. Bowser, ... e A. Heiss. 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of eukaryotic microbiology* 59:429–514.
- Adl, S. M., A. G. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta,... e M. F. Taylor. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52:399–45.
- Albuquerque, M. C., e M. C. Brasil-Sato. 2010. First report of *Calyptospora* sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) in forage characid fish from the Três Marias Reservoir, São Francisco Basin, Brazil. *European Journal of Protistology* 46:150–152.
- Andrade, D. R., M. V. J. Vidal, e E. Shimoda. 1998. Criação do trairão *Hoplias lacerdae*. Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF. Boletim Técnico 3, 4.
- Azevedo, C., P. Matos, e E. Matos. 1993. Morphological data of *Calyptospora spinosa* n. sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) parasite of *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 (Teleostei) from Amazon River. *European Journal of Protistology* 29:171–175.
- Baneth, G., e V. Shkap. 2003. Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*. *Journal of Parasitology* 89:379–381.
- Barros, L.A., J. Moraes Filho; e R. L. Oliveira. 2007. Larvas de nematoides de importância zoonótica encontradas em traíras (*Hoplias malabaricus* Bloch, 1794) no município de Santo Antonio do Leverger, MT. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 59:533–535.
- Barta, J. R., J. D. Ogedengbe, D. S. Martin, e T. G. Smith. 2012. Phylogenetic position of the adeleorinid coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rDNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59:171–180.

- Barta, J. R. 2000. Suborder Adeleorina Leger, 1911. *Illustrated guide to the protozoa, 1*, 308-318.
- Békési, L., e K. Molnár. 1991. *Calyptospora tucunarensis* n. sp. (Apicomplexa: Sporozoa) from the liver of tucunare *Cichla ocellaris* in Brazil. *Systematic Parasitology* 18:127–132.
- Beliene, G. H., Rocha, A. R. M., e de Souza, C. M. M. (2014). Parâmetros Alimentares de *Hoplias malabaricus*, como ferramenta de análise Ambiental na Lagoa Feia, RJ, Brasil. *E&S Engineering and Science*, 1(1), 116-124.
- Bonar, C. J., S. L. Poynton, F. Y. Schulman, R. L. Rietcheck, e M. M. Garner. 2006. Hepatic *Calyptospora* sp. (Apicomplexa) infection in a wild-born, aquarium-held clutch of juvenile arapaima *Arapaima gigas* (Osteoglossidae). *Diseases of Aquatic Organisms* 70:81–92.
- Davies, AJ, e Smit, NJ (2001). O ciclo de vida de *Haemogregarina bigemina* (Adeleina: Haemogregarinidae) em hospedeiros sul-africanos. *Folia parasitologica*, 48 (3), 169-177.
- Davies, A. J., e M. R. L. Johnston. 2000. The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibia and reptiles. *Advances in Parasitology* 45:1–107.
- Da Silva Negrão, M. C., M. R. L. da Silva, M. N. Videira, e L. A. Viana. 2019. Prevalence and molecular characterisation of *Calyptospora* parasites Overstreet, Hawkins and Fournié, 1984 (Apicomplexa: Calyptosporidae) in fishes from the eastern Amazon, Brazil. *Parasitology International* 73:101975.
- De-Albuquerque, M. C., e M. de C. Brasil-Sato. 2010. First report of *Calyptospora* sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) in forage characid fish from the Três Marias Reservoir,

- São Francisco Basin, Brazil. *European Journal of Protistology* 46:150–152.
- De Castro Demoner, L., M. R. L. da Silva, N. M. Magro, e L. H.O'Dwyer. 2019. *Hepatozoon milleri* sp. nov. (Adeleorina: Hepatozoidae) in *Akodon montensis* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) from southeastern Brazil. *Parasitology* 146:662–669.
- De Souza, W., e Attias, M. 2010. Subpellicular microtubules in apicomplexa and trypanosomatids. In *Structures and Organelles in Pathogenic Protists* (pp. 27-62). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Desser, S. S. 1990. Tissue "cysts" of *Hepatozoon griseisciuri* in the grey squirrel, *Sciurus carolinensis*: The significance of these cysts in species of *Hepatozoon*. *The Journal of Parasitology* 76:257–259.
- Desser, S. S. 1993. The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. *Parasitic protozoa: Volume 4., (Ed. 2)*, 247-272.
- Dias, L. A. V. 2010. *Hepatozoon caimani* (Apicomplexa: Hepatozoidae) no jacaré Caiman yacare no Pantanal Sul Mato-Grossense: prevalência e transmissão (Doctoral dissertation).
- Ehman, K. D., e M. E. Scott. 2002. Female mice mate preferentially with non-parasitized males. *Parasitology* 125:461–466.
- Eiras, J. C., R. M. Takemoto, G. C. Pavanelli, e J. L. Luque. 2012. Checklist of protozoan parasites of fishes from Brazil. *Zootaxa* 3221:1–25.
- Esteves-Silva, P. H., M. R. L. da Silva, L. H. O'Dwyer, M. Tavares-Dias, e L. A. Viana. 2019. *Haemogregarina daviesensis* sp. nov. (Apicomplexa: Haemogregarinidae) from South American lungfish *Lepidosiren paradoxa* (Sarcopterygii: Lepidosirenidae) in the eastern Amazon region. *Parasitology Research* 118:2773–2779.

- Garcia-Longoria, L., A. P. Møller, J. Balbontín, F. De Lope, e A. Marzal. 2015. Do malaria parasites manipulate the escape behavior of their avian hosts? An experimental study. *Parasitology Research* 114:4493–4501.
- Gemi, G., R. L. Lui, F. R. Treco, L. M. Paiz, R. M. Moresco, e V. P. Margarido. 2014. Basic cytogenetics and physical mapping of 5S and 18S ribosomal genes in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Characiformes, Erythrinidae) from isolated natural lagoons: a conserved karyomorph along the Iguaçu river basin. *Comparative cytogenetics* 8:211.
- Goulding, M. 1980. The fishes and the forest. Explorations in Amazonian Natural History. University of California Press, Los Angeles, California, USA.
- Harris, D. J., J. P. Maia, e A. Pereira. 2011. Molecular characterization of *Hepatozoon* species in reptiles from the Seychelles. *Journal of Parasitology* 97:106–111.
- Horeau, V., Cerdan, P., Champeau, A., e Richard, S. 1998. Importance of aquatic invertebrates in the diet of rapids-dwelling fish in the Sinnamary River, French Guiana. *J Trop Ecol* 14:851–864.
- Hrazdilová, K., B. Cervená, C. Blanvillain, P. Foronda, e D. Modrý. 2021. Quest for the type species of the genus *Hepatozoon* – phylogenetic position of hemogregarines of rats and consequences for taxonomy. *Systematics and Biodiversity* 1–10.
- Johnson, E. M., Allen, K. E., Panciera, R. J., Little, S. E., e Ewing, S. A. 2008. Infectividade de cistozoítos de *Hepatozoon americanum* para cães. *Veterinary parasitology* 154:1-2, 148-150.
- Lainson R., I. Paperna, e R. D. Naiff. 2003. Development of *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909) Pessôa, De Biasi & De Souza, 1972 in the Caiman Caiman c. crocodilus, the Frog *Rana catesbeiana* and the Mosquito *Culex fatigans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*

98:103–113.

Laakkonen, J., A. Sukura, A. Oksanen, H. Henttonen, e T. Soveri. 2001. Haemogregarines of the genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina) in rodents from northern Europe. *Folia Parasitologica* 48:263–267.

Levine, N. D. 2018. The Protozoan Phylum Apicomplexa: Volume 2. CRC Press.

Levine, N. D. 1980. The protozoan phylum Apicomplexa. Volume 1. CRC Press. Inc., Boca Raton, Florida, USA.

Luz, R. K., Salaro, A. L., e Zaniboni Filho, E. 2000. Avaliação de canibalismo e comportamento territorial de alevinos de trairão (*Hoplias lacerdae*). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 22:465-469.

Maciel, C. M., A. M. Júnior, E. A. Lanna, e E. Menin. 2009. Anatomia funcional da cavidade bucofaringiana de trairão, *Hoplias lacerdae* Miranda Ribeiro, 1908 (Characiformes, Erythrinidae). *Biotemas* 22:95–102.

Maia, J. P., S. Carranza, e Harris D. J. 2016. Comments on the systematic revision of adeleid haemogregarines: Are more data needed? *Journal of Parasitology* 102:549–552.

Magro, N. M. 2013. Prevalência de hemogregarinas em arraiais de água doce (Potamotrygonidae) da região norte, com descrição de uma nova espécie de gênero *Cyrlia*. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

Mathew, J. S., R. A. Van Den Bussche, S. A. Ewing, J. R. Malayer, B. R. Latha, e R. J. Panciera. 2000. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life-cycle characters. *The Journal of Parasitology*

86:366–372.

- Mattox, G. M., M. Toledo-Piza, e O. T. Oyakawa .2006. Estudo taxonômico de *Hoplias aimara* (Valenciennes, 1846) e *Hoplias macrophthalmus* (Pellegrin, 1907) (Ostariophysi, Characiformes, Erythrinidae). *Copeia* 2006:516–528.
- Megía-Palma, R., D. Paranjpe, S. Reguera, J. Martínez, R. D. Cooper, P. Blaimont, S. Merino, and B. Sinervo. 2018. Multiple color patches and parasites in *Sceloporus occidentalis*: Differential relationships by sex and infection. *Current Zoology* 0:1–9.
- Meunier, F. J., D. De Mayrinck, P. M. e Brito. 2015. Presence of plicidentine in the labial teeth of *Hoplias aimara* (Erythrinidae; Ostariophysi; Teleostei). *Acta Zoologica* 96:174–180.
- Montenegro, A. K. A., A. C. B. Vieira, M. M. L. Cardoso, Souza, J. E. R. T. D., e M. C. Crispim. 2013. Piscivory by *Hoplias* aff. *malabaricus* (Bloch, 1794): a question of prey availability? *Acta Limnologica Brasiliensia* 25:68–78.
- Moreira, J., T. Scholz, e J. L. Luque. 2015. First data on the parasites of *Hoplias aimara* (Characiformes): description of two new species of gill monogeneans (Dactylogyridae). *Acta Parasitologica* 60:254–260.
- Morrison, D. A. 2008. Prospects for elucidating the phylogeny of the Apicomplexa. *Parasite Journal* 15:191–196.
- O'Donoghue, P. 2017. Haemoprotozoa: making biological sense of molecular phylogenies. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 6:241–256.
- Oliveira, J. P., M. R. André, J. R. F. Alves Júnior, A. P. G. Lustosa, e K. Werther. 2018. Molecular detection of hemogregarines and haemosporidians in Brazilian free-living testudines. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 7:75–84.

- Overstreet, R. M., W. E. Hawkins, e J. W. Fournie. 1984. The Coccidian Genus *Calyptospora* and Family Calyptosporidae n. fam. (Apicomplexa), with Members Infecting Primarily Fishes 1. *The Journal of Protozoology* 31:332–339.
- Oyakawa, O. T. 1998. Relações filogenéticas das famílias Pyrrhulinidae, Lebiasinidae e Erythrinidae (Osteichthyes: Characiformes). Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Oyakawa, O. T. 2003. Family Erythrinidae. Pages 238–240 in R. E. Reis, Kullander S. O., and Ferraris Jr C.J., editors. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Oyakawa, O. T., e G. M. Mattox .2009. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. *Neotropical Ichthyology* 7:117–140.
- Paperna, I., e R. Lainson. 2004. *Hepatozoon cf. terzii* (Sambon & Seligman, 1907) infection in the snake *Boa constrictor constrictor* from north Brazil: transmission to the mosquito *Culex quinquefasciatus* and the lizard *Tropidurus torquatus*. *Parasite* 11:175– 181.
- Perkins, S. L., E. S. Martinsen, e B. G. Falk. 2011. Do molecules matter more than morphology? Promises and pitfalls in parasites. *Parasitology* 138:1664–1674.
- Perkins, S. L. 2000. Species concepts and malaria parasites: detecting a cryptic species of *Plasmodium*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 267:2345–2350.
- Pereira, G.R., Soares, P., Gomes, M.Q., Viana, L.A., de Abreu Manso, P.P., Machado, M.P., Lourenço-de-Oliveira, R. 2014. Are fish paratenic natural hosts of the caiman haemoparasite *Hepatozoon caimani*? *Parasitol Res* 113:39–45.

- Planquette, P., P. Keith e P. Y. Le Bail. 1996. Atlas des poissons d'eau douce de Guyane. Tome I. *Muséum Nationale d'Histoire Naturelle*, Paris.
- Pompeu, P. D. S., e A. L. Godinho. 2001. Mudança na dieta da traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch) (Erythrinidae, Characiformes) em lagoas da bacia do rio Doce devido à introdução de peixes piscívoros. *Revista Brasileira de Zoologia* 18:1219–1225.
- Prado, C. P. A., Gomiero, L. M., e Froehlich, O. 2006. Spawning and parental care in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae) in the southern Pantanal, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 66, 697-702.
- Pessôa, S. B., e J. Cavalheiro. 1969. Notas sobre hemogregarinas de serpentes Brasileiras. IX. Sobre a hemogregarina da *Helicops carinicauda* (Wied). *Revista Goiana de Medicina* 15:161–168.
- Pessôa, S. B., e J. Cavalheiro. 1969. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras – VII. *Revista Brasileira de Biologia* 29:351–354.
- Ramos, A. B. M. A., dos Santos, P. D. F. S., Hemeterio, L. C. A., dos Santos, W. J. P., de Araújo, R. S., e Matos, E. R. 2018. COCCIDIOSE HEPÁTICA EM *Aspistor quadriscutis*, Valenciennes, 1840 (TELEOSTEI: ARIIDAE) CAPTURADOS NO ESTUÁRIO DO NORDESTE PARAENSE, AMAZÔNIA, BRASIL. *Archives of Veterinary Science*, 23(3).
- Sassi, de M. C., F. Perez, M. F. Oliveira, V. C. S. Oliveira, G. A. Deon, F. H. de Souza, P. H. Ferreira, e B. M. Cioffi. 2021. High Genetic Diversity despite Conserved Karyotype Organization in the Giant Trahiras from Genus *Hoplias* (Characiformes, Erythrinidae). *Genes* 12:252.
- Schall, J. J. 1992. Parasite-mediated competition in *Anolis* lizards. *Oecologia* 92:58–64.

- Sember, A., L. A. Bertollo, P. Ráb, C. F. Yano, T. Hatanaka, E. A. de Oliveira, e M. D. B. Cioffi. 2018. Sex chromosome evolution and genomic divergence in the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Frontiers in genetics* 9:71.
- Siddall, M. E. 1995. Phylogeny of adeleid blood parasites with a partial systematic revision of the haemogregarine complex. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42:116–125.
- Silva M. C., S. C. São Clemente, J. A. Picanço Júnior, M.V.O. Silva, e E. R. Matos. 2012. *Calyptospora* sp. in *Brachyplatystoma vaillantii* trapped at the Vigia, State of Pará, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 21:176–178.
- Silva, M. F., D. T. da Silva, E. G. Giese, I. G. Hamoy, e E. R. Matos. 2019. Morphology and Phylogeny of *Calyptospora paranaidji* n. sp. (Eimeriorina: Calyptosporidae), an Apicomplexan Parasite of the Hepatic Tissue of *Cichla piquiti* Kullander & Ferreira, 2006, From a Reservoir in the Brazilian Amazon Region. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 66:608–616.
- Sloboda, M., M. Kamler, J. Bulantová, J. Votýpka, e D. Modrý. 2007. A new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Python regius* (Serpentes: Pythonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector. *Journal of Parasitology* 93:1189–1198.
- Smith, TG, Walliker, D., e Ranford-Cartwright, LC (2002). Diferenciação sexual e determinação do sexo na Apicomplexa. *Trends in parasitology* 18 (7), 315-323.
- Smith, T. G. 1996. The genus *Hepatozoon* (apicomplexa: adeleina). *J Parasitol* 82:565–585.
- Taphorn, D. C. 1992. The characiform fishes of the Apure River drainage, Venezuela. Tese de Doutorado – Muses de Ciências Naturais, UNELLEZ, Guanare, Venezuela.

- Telford Jr., S. R. 2009. Hemoparasites of the Reptilia: Color atlas and text. CRC Press, Florida, USA.
- Úngari, L. P., A. L. Santos, L. H. O'Dwyer, M. R. Da Silva, T. C. Santos, M. J. Da Cunha, e M. C. Cury. 2018. Molecular characterization and identification of *Hepatozoon* species Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in captive snakes from Brazil. *Parasitology Research* 117:3857–3865.
- Viana, L. A., P. Soares, J. E. Silva, F. Paiva e M. E. Coutinho. 2012. Anurans as paratenic hosts in the transmission of *Hepatozoon caimani* to caimans *Caiman yacare* and *Caiman latirostris*. *Parasitology Research* 11:883–886.
- Votýpka, J, D. Modrý, M. Oborník, J. Šlapeta, e J. Lukeš. 2017. Apicomplexa. 567–634 in J. M. Archibald, A. G. B. Simpson, and C. H. Slivovitz, editors. Handbook of the Protists. Springer, Cham, Switzerland.
- Whipps, C. M., J. W. Fournie, D. A. Morrison, C. Azevedo, E. Matos, P. Thebo, e M. L. Kent. 2012. Phylogeny of fish-infecting *Calypptospora* species (Apicomplexa: Eimeriorina). *Parasitology Research* 111:1331–1342.
- Wozniak, E. J., Kazacos, K. R., Telford Jr, S. R., & McLaughlin, G. L. 1996. Characterization of the clinical and anatomical pathological changes associated with *Hepatozoon mocassini* infections in unnatural reptilian hosts. *International Journal for Parasitology*, 26(2), 141-146.
- Wozniak, E. J., e Telford Jr, S. R. 1991. The fate of *Hepatozoon* species naturally infecting Florida black racers and watersnakes in potential mosquito and soft tick vectors, and histological evidence of pathogenicity in unnatural host species. *International journal for parasitology*, 21(5), 511-516.

Zechmeisterová, K., H. Javanbakht, J. Kvicerová, e P. Siroký. 2021. Against growing synonymy: Identification pitfalls of Hepatozoon and Schellackia demonstrated on North Iranian reptiles. *European Journal of Protistology* 125780.

8. Capítulo 1

Hepatozoon PARASITES (APICOMPLEXA: HEPATIZOIDAE) IN FISHES *Hoplias aimara* (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE) FROM THE EASTERN AMAZON, BRAZIL

Artigo submetido ao periódico "Parasitology Research"

1 ***Hepatozoon* parasites (Apicomplexa: Hepatozoidae) in *Hoplias aimara* fish**
2 **(Characiformes, Erythrinidae) from the Eastern Amazon, Brazil**

3

4 **Wagner Amanajás Cardoso¹ · Livia Perles² · Amanda Picelli³ · Jamille Karina Coelho**
5 **Correa⁴ · Marcos Rogério André² · Lúcio André Viana^{1,4}**

6

7 ¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, Universidade Federal do Amapá –
8 UNIFAP, Macapá, AP, Brazil

9 ²Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única,
10 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista
11 (FCAV/UNESP), Jaboticabal, SP, Brazil

12 ³Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Fundação Universidade Federal de
13 Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

14 ⁴Laboratório de Estudos Morfofisiológicos e Parasitários, Departamento de Ciências Biológicas
15 e da Saúde, Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, Macapá, AP, Brazil

16

17

18 Corresponding author: Lúcio André Viana

19 e-mail: lucviana74@gmail.com

20 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0932-0479>

21

22

23

24 Abstract

25 This study reports the occurrence of parasites belonging to the *Hepatozoon* genus in fish (*Hoplias*
26 *aimara*) from the Eastern Amazon. Fish (n=54) were sampled from the Fausino River, located in the
27 Amapá National Forest (FLONA), in the state of Amapá, northern Brazil. Fresh liver preparations were
28 examined in the field between a slide and a cover slip under a light microscope. Cysts containing
29 *Hepatozoon* cystozoites were observed in the liver of 5 (9%) out of 54 *H. aimara* individuals. The cysts
30 were ovoid (mean dimensions 10.28 × 9.8 µm), presenting up to four elongated cystozoites (mean
31 dimensions 11.04 × 1.68 µm), containing 1 to 4 residual bodies of different sizes. A single liver sample
32 containing cysts was submitted to DNA extraction and PCR analyses based on a fragment of the 18S
33 rRNA gene. The sequencing revealed a 465bp fragment exhibiting 99% query coverage and 98.7%
34 identity with *Hepatozoon caimani* (MF322538 and MF322539), detected in caimans (*Caiman yacare*)
35 from Brazil. This is the first report of the occurrence of cysts containing *Hepatozoon* cystozoites in free-
36 living fishes.

37

38 **Keywords:** Floresta Nacional do Amapá, Paratenic hosts, Trophic transmission, 18S rRNA gene

39

40

41 Introduction

42 Parasites belonging to the *Hepatozoon* genus comprise protozoa from the Phylum Apicomplexa,
43 able to infect a wide variety of invertebrate and vertebrate hosts (Smith 1996). The life cycle of these
44 parasites can involve different hosts and transmission routes. One of the latter consist in the ingestion of
45 hematophagous arthropods (definitive hosts) containing sporulated oocysts by vertebrates (intermediate
46 hosts). A second route involves the ingestion of paratenic hosts (insectivorous/omnivorous vertebrates) by
47 predators. Paratenic hosts ingest infected vectors, leading to the formation of cysts containing infectious
48 cystozoites in various tissues. In predators, the parasites multiply in different viscera, culminating in the
49 appearance of gametocytes in the bloodstream (Landau et al. 1970; Landau et al. 1972).

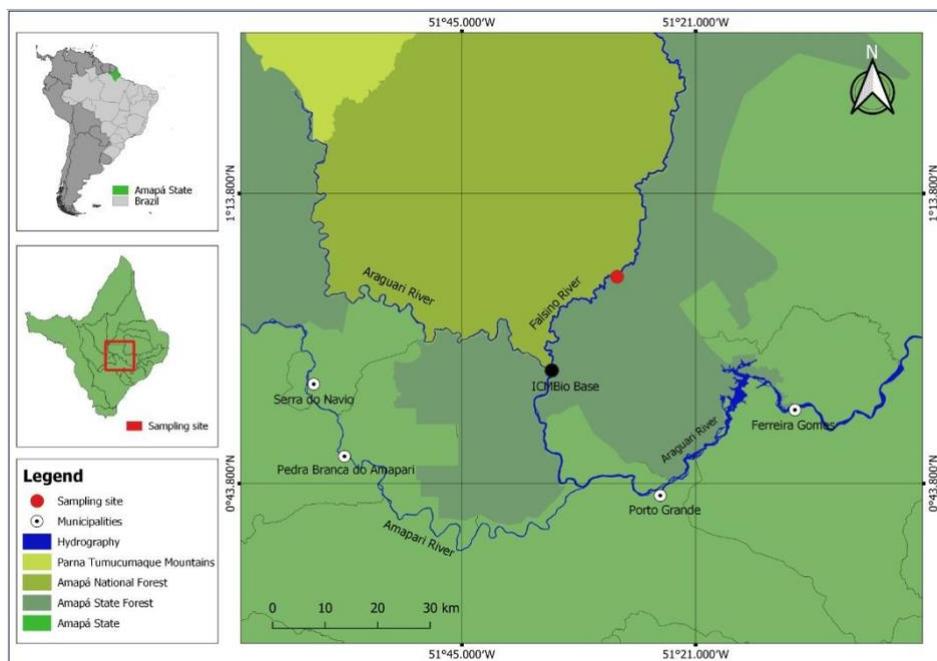
50 *Hoplias aimara* (Valenciennes, 1846) is a teleost fish from South America (Meunier 2015),
51 popularly known as trahira, manjuma and wolf fish (Oyakawa and Mattox 2009). They occur in lotic
52 environments, such as small to large rivers and waterfalls, and strictly lentic waters, *i.e.*, lakes and
53 reservoirs (Oyakawa and Mattox 2009). These fish display carnivorous feeding habits, preferably
54 ichthyophagous, based on small fish, insects and shrimp (Maciel 2009).

55 Although the presence of cysts containing *Hepatozoon* spp. is probably frequent in nature, with
56 records for dogs (Baneth and Shkap 2003), rodents (Desser 1990; Laakkonen et al. 2001; Johnson et al.
57 2008; Castro-Demoner et al. 2019), anurans (Viana et al. 2012) and reptiles (Lainson et al. 2003; Paperna
58 and Lainson 2004), no report of these forms in fish is noted to date. Thus, this study aims to record the
59 occurrence of *Hepatozoon* sp. cystozoites in *H. aimara* fish from the Eastern Amazon, through
60 morphological, morphometric and molecular characterization, while also verifying of their phylogenetic
61 relationships.

62

63 Material and Methods

64 Trahiras were sampled from the Fausino River, located in the Amapá National Forest (FLONA),
65 in the state of Amapá (Fig. 1), Brazil (1°05'14.11"N, 51°29'06.016"W). The region is delimited by the
66 Araguari, Falsino and Mutum rivers, and located in the central region of the state of Amapá, covering
67 412,000 ha, comprising the Ferreira Gomes, Amapá and Tartarugalzinho municipalities (Brandão and
68 Silva 2009). FLONA's landscape is composed of well-preserved '*terra firme*' (upland forests) and
69 floodplain ecosystems of significant biological importance (Benício and Lima 2017). This region is also a
70 sustainable use area that currently houses a small traditional population that develops agricultural,
71 extractive and fishing activities (Brandão and Silva 2009; Dos Santos et al., 2016).



72

73 **Fig. 1** Location of *Hoplias aimara* samples in the Amapá National Forest, Fausino River.

74

75 Samplings were carried out using nets, fishing rods and a rag. The animals were stunned by
76 direct spraying of a 100 mg L⁻¹ benzocaine-based aqueous solution (Honczaryk and Inoue 2010). A total
77 of 54 *H. aimara* individuals were collected, 11 in the first campaign (07-09/09/2019), 20 in the second
78 (20-22/09/2019), both performed during the dry season of the Fausino River, and 23 specimens in the
79 third (1-2/02/2020) campaign, during the flood period. After obtaining blood from the caudal artery, fish
80 were euthanized by medullary sectioning at the base of the occipital. Some of the fish carcasses were
81 fully used by traditional fishers and others sent to the Amapá Scientific and Technological Research
82 Institute (IEPA) for species identification.

83 Still in the field, fresh squash preparations of fragments of liver were examined under coverslips,
84 while another part was preserved in 96% ethanol for molecular assays. The blood slides were fixed with
85 absolute methanol for 3 min and stained with 10% Giemsa for 30 min (Hull and Camin 1960; Telford et
86 al. 2001). The slides were examined under a light microscope with magnifications of x400 and x1,000.
87 The parasitic forms were registered with a digital camera attached to a microscope (Trinocula DI-136T
88 Microscope with 5.1 MP Camera). Morphometry was performed using Image View® software.
89 Morphometric data was described in micrometers (µm) and variables, such as the length, width and area
90 (µm²) of parasites, were presented as means, followed by standard deviation and amplitude.

91 Total DNA was extracted from the liver samples of *H. aimara* (WAT-37) using the DNeasy
92 Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Valencia, CA), following the manufacturer's protocol. The detection of
93 the DNA of the parasites by PCR (polymerase chain reaction) was performed using the Hep300 (5'-GTT
94 TCT GAC CTA TCA GCT TTC GAC G-3') and Hep900 (5'-C AAA TCT AAG AAT TTC ACC TCT
95 GAC-3') primers, which amplified a fragment of ≈ 600 base pairs (bp) of the 18S rRNA gene for
96 sequencing and phylogenetic analysis (Ujvari et al. 2004). The PCR consisted of a pre-PCR step at 94 °C
97 for 3 min, followed by 45 cycles of 94 °C for 45 s, one cycle at 56 °C for 1 min, an extension at 72 °C for
98 40 s, and a final extension at 72 °C for 10 min. The amplicons were purified using Wizard® SV Gel and
99 the PCR Clean-Up System, according to the manufacturer's instructions. PCR products were sequenced
100 using the BigDye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster
101 City, CA, USA) and the ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using
102 Sanger methodology (Sanger et al. 1977).

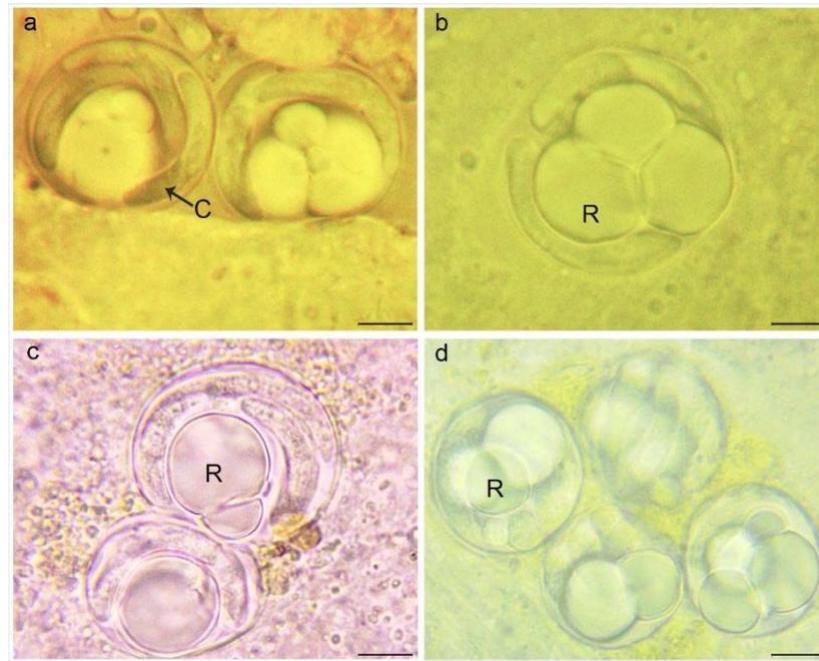
103 One amplified sequence was edited and the consensus sequence was built using the BioEdit
104 software v7.2.5 (Hall 1999). The identity, query coverage and E-values were assessed by BLASTn tool

105 (using default parameters), available in the NCBI GenBank database (available online:
106 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul et al. 1990). The obtained sequence was aligned with
107 other sequences retrieved from GenBank using MAFFT software, version 7 (Kato et al. 2019) producing
108 an alignment of 481 bp (including gaps). For Maximum likelihood (ML) inference, “best of fit” was
109 selected by the program jModelTest2 (version 2.1.6) on 11 XSEDE19, under the Akaike Information
110 Criterion (AIC) (Darriba et al. 2012). Tree was constructed with IQ-TREE software (Trifinopoulos et al.
111 2016) with 1,000 bootstrap replicates. The phylogenetic tree edition and rooting (outgroup) were
112 performed using the Treegraph 2.0 beta software.

113

114 **Results**

115 The presence of cysts containing cystozoites was detected in 5 (9%) out of 54 *H. aimara* specimens
116 during the fresh livers assessments. The positive fish WAT-08 was caught during the first campaign,
117 WAT-27 during the second and WAT-37, 40 and 41 during the third. Samples WAT-8 and WAT-27,
118 collected during the dry season, and WAT-37, collected during the rainy season, were used for DNA
119 extraction. However, only WAT-37 presented good criteria for use in the amplification and construction
120 of the phylogenetic tree. The cysts were ovoid, containing up to four cystozoites, with 1 to 4 residual
121 bodies of different sizes (Fig. 2). The cysts measured $10.28 \pm 0.91 \times 9.8 \pm 0.85 \mu\text{m}$, the cystozoites
122 displayed an elongated "banana" shape, $11.04 \pm 0.79 \times 1.68 \pm 0.04 \mu\text{m}$ sized, and the residual bodies were
123 $4.81 \pm 0.93 \times 4.24 \pm 0.99 \mu\text{m}$ in size. Length, width, area, means and standard deviations were obtained
124 from the measurement of 13 cysts containing *Hepatozoon* sp. (Table 1). Clustered cysts in the hepatic
125 parenchyma, encapsulated and in the lumen of tubular structure was observed (Fig 2). It is noteworthy
126 that hepatozoid gametocytes were not found in *H. aimara* blood smears.



128

129 **Fig. 2** Living cysts of *Hepatozoon* sp. in squash preparations of liver from *Hoplias aimara*. A. Cysts
 130 monozoic, dizoic and hexazoic cysts (one cystozoite in the latter is in a different focal plane). c:
 131 cystozoite; R: residual body. Bar =10 μ m.

132

133 Table 1. Morphometric characteristics of the *Hepatozoon* cystozoites cysts found in the trairão (*Hoplias*
 134 *aimara*) from Fausino River Basin, Amapá National Forest, Brazil. Measurements are presented as mean
 135 \pm standard deviation (SD) followed by range (maximum and minimum values).

	Length (μ m)	Width (μ m)	Area (μ m ²)
Cysts	10.19 \pm 0.91 (11.88 – 8.76)	9.85 \pm 1.02 (11.6 – 8.66)	82.8 \pm 14.6 (110.06 – 66.6)
Cystozoites	10.9 \pm 1.08 (12.78 – 9.32)	1.71 \pm 0.91 (1.89 – 1.27)	15.4 \pm 2.14 (20.33 – 12.01)
Residual body	4.7 \pm 0.87 (5.84 – 2.88)	4.7 \pm 0.87 (5.84 – 2.88)	16.9 \pm 5.53 (25.95 – 6.3)

136

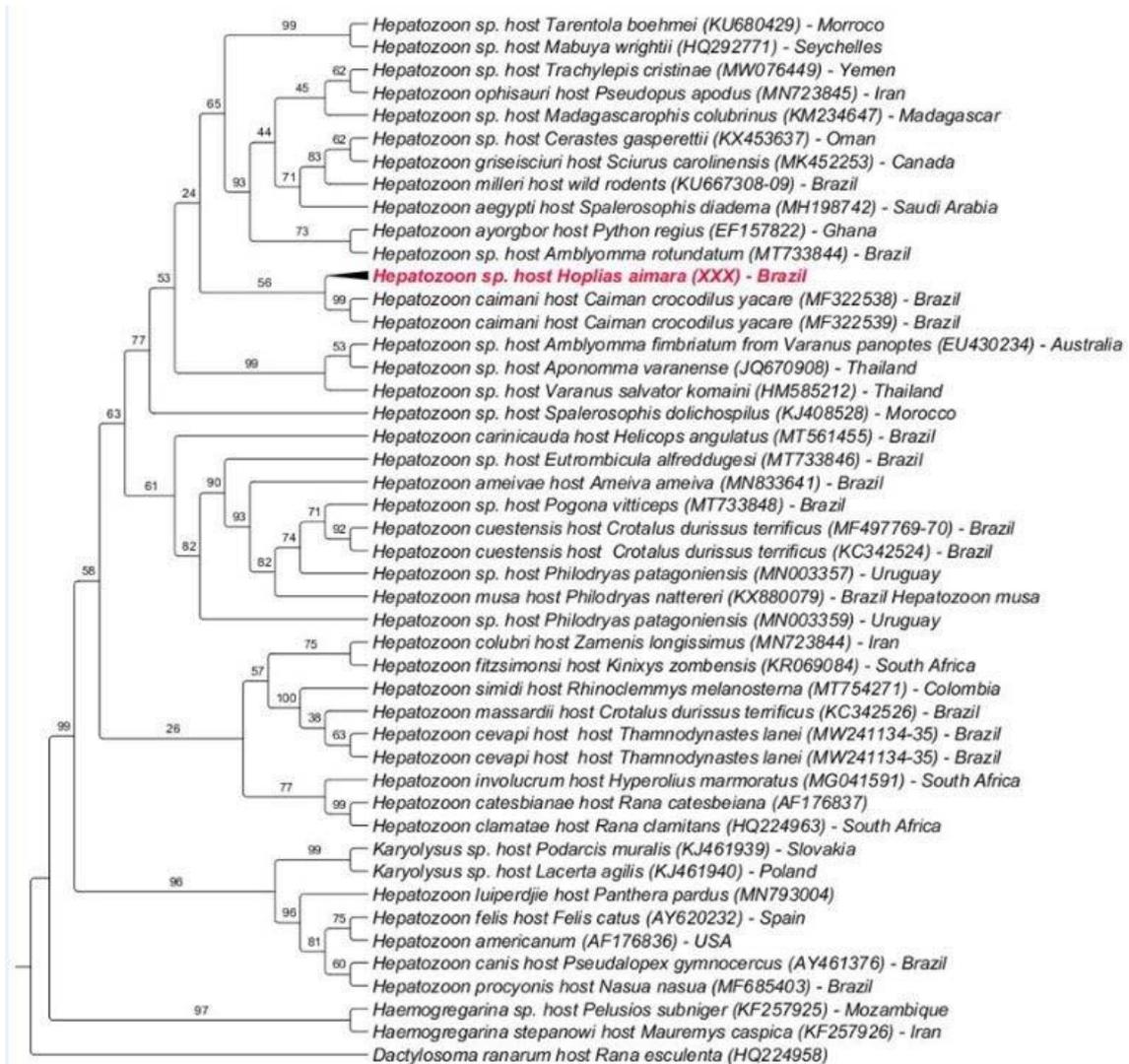
137 Phylogenetic analysis based on a 481 pb alignment of the 18S rRNA gene inferred by the ML
 138 method and TPM2+G evolutionary model showed the formation of a clade including the sequence
 139 detected in the present study with *Hepatozoon. caimani* (Carini, 1909) detected in Caiman from Brazil,
 140 supported by 56% of bootstrap (Fig. 3).

141

142

143

144



145

146 **Fig. 3** Phylogenetic tree based on an alignment of 481 bp fragment of hemogregarine 18S rRNA
 147 sequences, using ML method and TPM2+G evolutionary model. Numbers at nodes correspond to
 148 bootstrap. Accession numbers are indicated in the sequences. Sequence of *Hepatozoon* sp. detected in the
 149 present study is highlighted in bold red. *Haemogregarina* spp. and *Dactylosoma ranarum* were used as
 150 outgroups.

151

152 Discussion

153 This is the first record of a fish species naturally infected by *Hepatozoon*, where numerous cysts
 154 containing cystozoites were found in the liver parenchyma of five *H. aimara* specimens. The findings
 155 confirm the circulation of these parasites in these vertebrates, which probably behave as paratenic hosts in
 156 the natural environment. The results of the phylogenetic analysis based on an 18S rRNA gene fragment
 157 suggest the occurrence of a potential new *Hepatozoon* species, phylogenetically related to *Hepatozoon*
 158 *caimani* (Pessôa et al. 1972).

159 The host-parasite system formed by *H. caimani*, crocodilians and vector mosquitoes is one of the
160 most detailed, since parasite description by Carini, in 1909. In the Pantanal region, *Culex (Melanoconion)*
161 spp. has been identified as natural vectors of these parasites (Viana et al. 2010). Subsequently, the
162 transmission of the parasite to anurans (*Rana catesbeiana*) and fishes (*Metynnis* sp.) has been carried out
163 experimentally through the ingestion of mosquitoes that had undergone a blood meal from infected
164 caimans (*Caiman yacare*) by both anurans and fishes (Viana et al. 2012; Pereira et al. 2014). In both
165 studies, experimental infection of *H. caimani* in non-parasitized *C. yacare* was obtained through the
166 ingestion of the viscera of the aforementioned paratenic hosts.

167 Regarding the origin of the *Hepatozoon* infection recorded herein in *H. aimara*, some
168 considerations are possible. The direct ingestion of mosquitoes infected with *Hepatozoon* sp. by trahira
169 fingerlings in the wild is a likely hypothesis. Frequently, pregnant female mosquitoes, such as *Culex*
170 (*Melanoconion*) spp. die during or shortly after laying their eggs in shallow water collections. When they
171 fall to the surface of the water, they tend to move repeatedly, attracting predators such as insectivorous
172 and omnivorous fish. (Pereira et al. 2014). In a study on the diet of *H. aimara* fish in the French Guiana,
173 ontogenetic variations concerning consumed items were observed, where adults consumed mainly fish,
174 and juveniles feed on Decapoda and other invertebrates (Horeau et al. 1998). Another plausible route of
175 infection would be the ingestion of insectivorous fish and anurans, as well as the occasional consumption
176 of terrestrial items such as crabs, iguanas and birds (Horeau et al. 1998). Considering that *Caiman*
177 *crocodilus* (Linnaeus, 1758), *Paleosuchus palpebrosus* (Cuvier, 1807) and *Paleosuchus trigonatus*
178 (Schneider, 1801) (IEPA 2006) are recorded for the study region, future studies should be conducted
179 aiming at the morphological and molecular detection of *Hepatozoon* spp. in crocodilians, aiming to
180 identify the intermediate vertebrate host of this putative novel *Hepatozoon* sp.

181 This study comprises the first report of *Hepatozoon* in naturally infected free-living fish. Given
182 the importance of this contribution, further studies are required to identify intermediate and definitive
183 hosts and characterize the parasitic forms, thus allowing for the description of this potentially new
184 *Hepatozoon* species in crocodilians.

185

186 **Acknowledgements** We are grateful to Adriane Ramires for her excellent work in editing the figures.

187 **Funding information** The present study was financed partly by the Brazilian National Council for
188 Scientific and Technological Development (CNPq Universal 429.132/2016-6 to LAV). MRA is a
189 fellowship receiver of CNPq (Productivity Grant - CNPq Process #302420/2017-7)

190 **Compliance with ethical standards**

191 **Conflict of interest** On behalf of all authors, the corresponding author states that there are no conflicts of
192 interest in relation to the present study.

193 **Ethical approval** All the procedures involving animals in the present study were approved by the ethics
194 committee on animal use of the Universidade Federal do Amapá (Federal University of Amapá) (protocol
195 number 018/2019), and the snake sampling and access to genetic data were authorized by the Brazilian
196 Ministry of the Environment (SISBIO number 70296-2 and SISGEN ACAB8EB, respectively).

197

198 **References**

199

200 Baneth G, Shkap V (2003) Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*. J Parasitol 89:379–381.
201 [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0379:MCOHC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0379:MCOHC]2.0.CO;2).

202 Benício RA, Lima JD (2017) Anurans of Amapá National Forest, Eastern Amazonia, Brazil. Herpetol
203 Notes 10:627–633. <https://www.biotaxa.org/hn/article/view/31651>.

204 Brandão FC, Silva LMA (2009) Conhecimento ecológico tradicional dos pescadores da Floresta Nacional
205 do Amapá. Sci Mag UAKARI 4:55–66.

206 Carvalho LN, Fernandes CHV, Moreira VSS (2002) Alimentação de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794)
207 (Osteichthyes, Erythrinidae) no rio Vermelho, Pantanal Sul Mato-Grossense. Rev Bras Zoo 4:227–
208 236.

209 Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada R (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and
210 parallel computing. Nat Methods 9:772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.

211 Davies AJ, Johnston MRL (2000) The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibia and
212 reptiles. Adv Parasitol 45:1–107. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(00\)45003-7](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(00)45003-7).

213 De Almeida VLL, Hahn NS, Vazzoler ADM (1997) Feeding patterns in five predatory fishes of the high
214 Paraná River floodplain (PR, Brazil). *Ecol Freshw Fish* 6:123–133.
215 <https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.1997.tb00154.x>

216 Castro-Demoner L, da Silva MRL, Magro NM, O'Dwyer LH (2019) *Hepatozoon milleri* sp.
217 nov.(Adeleorina: Hepatozoidae) in *Akodon montensis* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) from
218 southeastern Brazil. *Parasitol* 146:662–669. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001956>.

219 Desser SS (1990) Tissue "cysts" of *Hepatozoon griseisciuri* in the grey squirrel, *Sciurus carolinensis*: The
220 significance of these cysts in species of *Hepatozoon*. *J Parasitol* 76:257–259.
221 <https://doi.org/10.2307/3283027>.

222 De Sousa KCM, Fernandes MP, Herrera HM, Benevenuto JL, Santos FM, Rocha FL,... André MR (2017)
223 Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in domestic dogs and wild mammals in southern Pantanal,
224 Brazil with implications in the transmission route. *Vet Parasitol* 237:37–46.
225 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.023>.

226 Dos Santos AL, da Cunha FC, Soares MGM, de Souza LP, Florentino AC (2016) Conhecimento dos
227 pescadores artesanais sobre a composição da dieta dos pacus (Characiformes: Serrasalminidae) na
228 Floresta Nacional do Amapá, rio Araguari, Amapá, Brasil. *Biotemas* 29:101–111.
229 <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2016v29n2p101>.

230 Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and
231 methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML
232 3.0. *Syst Biol* 59:307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.

233 Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for
234 Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95–98.
235 https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29.

236 Horeau V, Cerdan P, Champeau A, Richard S (1998) Importance of aquatic invertebrates in the diet of
237 rapids-dwelling fish in the Sinnamary River, French Guiana. *J Trop Ecol* 14:851–864.
238 <https://doi.org/10.1017/S0266467498000613>.

239 Honczaryk A, Inoue LAKA (2010) Anestesia do pirarucu por aspersão da benzocaína diretamente nas
240 brânquias. Embrapa Amazônia Ocidental. Cienc Rural 40:204–207. [https://doi.org/10.1590/S0103-](https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000235)
241 [84782009005000235](https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000235).

242 Hull RW, Camin JH (1960) Haemogregarines in snakes: the incidence and identity of the erythrocytic
243 stages. J Parasitol 46:515–523. <https://doi.org/10.2307/3275151>

244 IEPA - Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá (2006) Inventários Biológicos
245 Rápidos da Floresta Nacional do Amapá – Expedições I e II. Macapá, Brazil.

246 Johnson EM, Allen KE, Panciera RJ, Little SE, Ewing SA (2008) Infectivity of *Hepatozoon americanum*
247 cistozoites for a dogs. Vet Parasitol 154:148–150. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.02.026>.

248 Johnson EM, Allen KE, Breshears MA, Panciera RJ, Little SE, Ewing SA (2008) Experimental
249 transmission of *Hepatozoon americanum* to rodents. Vet Parasitol 151:164–169.
250 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.017>.

251 Laakkonen J, Sukura A, Oksanen A, Henttonen H, Soveri T (2001) Haemogregarines of the genus
252 *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina) in rodents from northern Europe. Folia Parasitol 48:263–
253 267. <https://doi.org/10.14411/fp.2001.043>.

254 Landau I, Chabaud AG, Michel JC, Brygoo ER (1970) Mise en évidence d'un double mode de
255 transmission chez un *Hepatozoon* de reptiles malgaches. C R Acad Sc Paris Sér D 270:2308–2310.

256 Landau I, Michel JC, Chabaud AG (1972) Cycle biologique d'*Hepatozoon domerguei*; discussion sur les
257 caractères fondamentaux d'un cycle de Coccidie. Z Parasitenkd 38:250–270.

258 Lainson R, Paperna I, Roberto DN (2003) Development of *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909) Pessôa,
259 De Biasi & De Souza, 1972 in the *Caiman Caiman c. crocodilus*, the Frog *Rana catesbeiana* and
260 the Mosquito *Culex fatigans*. Mem Inst Oswaldo Cruz 98:103–113. [https://doi.org/10.1590/S0074-](https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000100014)
261 [02762003000100014](https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000100014).

262 Loureiro VE, Hahn NS (1996). Dieta e atividade alimentar da traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch,
263 1794)(Osteichthyes, Erythrinidae), nos primeiros anos de formação do reservatório de Segredo-
264 PR. Acta Limnol Bras 8:195–205.

265 Luz RK, Salaro AL, Zaniboni Filho E (2000) Avaliação de canibalismo e comportamento territorial de
266 alevinos de trairão (*Hoplias lacerdae*). Acta Sci Biol Sci 22:465–469.
267 <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v22i0.2929>

268 Maciel CMR, Júnior AM, Lanna EA, Menin E (2009) Anatomia funcional da cavidade bucofaringiana de
269 trairão, *Hoplias lacerdae* Miranda Ribeiro, 1908 (Characiformes, Erythrinidae). Biotemas 22:95–
270 102. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2009v22n3p95>.

271 Mattox, G. M., Toledo-Piza, M., & Oyakawa, O. T. (2006) Taxonomic study of *Hoplias aimara*
272 (Valenciennes, 1846) and *Hoplias macrophthalmus* (Pellegrin, 1907) (Ostariophysi,
273 Characiformes, Erythrinidae). Copeia 2006:516–528. [https://doi.org/10.1643/0045-
274 8511\(2006\)2006\[516:TSHAV\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2006)2006[516:TSHAV]2.0.CO;2).

275 Mazzoni R, Costa LD (2007) Feeding ecology of stream-dwelling fishes from a coastal stream in the
276 Southeast of Brazil. Braz Arch Biol Technol 50:627–635. [https://doi.org/10.1590/S1516-
277 89132007000400008](https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000400008)

278 Meunier FJ, De Mayrinck D, Brito PM (2015) Presence of plicidentine in the labial teeth of *Hoplias*
279 *aimara* (Erythrinidae; Ostariophysi; Teleostei). Acta Zool 96:174–180.
280 <https://doi.org/10.1111/azo.12065>.

281 Novakowski GC, Hahn NS, Fugi R (2007) Alimentação de peixes piscívoros antes e após a formação do
282 reservatório de Salto Caxias, Paraná, Brasil. Biota Neotrop 7:149–154.
283 <https://doi.org/10.1590/S1676-06032007000200017>

284 Oyakawa OT, Mattox GM (2009) Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-
285 group (Ostariophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. Neotrop
286 Ichthyol 7:117–140. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252009000200001>

287 Paperna I, Lainson R (2004) *Hepatozoon* cf. *terzii* (Sambon & Seligman, 1907) infection in the snake *Boa*
288 *constrictor constrictor* from north Brazil: transmission to the mosquito *Culex quinquefasciatus* and
289 the lizard *Tropidurus torquatus*. Parasite 11:175–181.
290 <https://doi.org/10.1051/parasite/2004112175>.

291 Pereira GR, Soares P, Gomes MQ, Viana LA, de Abreu Manso PP, Machado MP, Lourenço-de-Oliveira
292 R (2014) Are fish paratenic natural hosts of the caiman haemoparasite *Hepatozoon*
293 *caimani*? Parasitol Res 113:39–45. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3623-9>.

294 Pessoa SB, Biasi PD, Souza DMD (1972) Esporulação do *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909), parasita do
295 jacaré-de-papo-amarelo: *Caiman latirostris* Daud, no *Culex dolosus* (L. Arribálzaga). Memórias
296 do Instituto Oswaldo Cruz, 70, 379-383.

297 Piana PA, Gomes LC, Agostinho AA (2006) Comparison of predator–prey interaction models for fish
298 assemblages from the neotropical region. Ecol Model 192:259–270.
299 <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.07.002>

300 Pompeu PDS, Godinho AL (2001) Mudança na dieta da traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch)(Erythrinidae,
301 Characiformes) em lagoas da bacia do rio Doce devido à introdução de peixes piscívoros. Rev
302 Bras Zool 18:1219–1225. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752001000400016>.

303 Sabino J, Zuanon JAS (1998) A stream fish assemblage in Central Amazonia: distribution, activity
304 patterns and feeding behavior. Ichthyol Explor Freshwaters 8:201–210.

305 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl
306 Acad Sci 74:5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

307 Sloboda M, Kamler M, Bulantová J, Votýpka J, Modrý D (2008) Rodents as intermediate hosts of
308 *Hepatozoon ayorgbor* (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) from the African ball python,
309 *Python regius*? Folia Parasitol 55:13–16. <https://doi.org/10.14411/fp.2008.003>.

310 Smith TG (1996) The genus *Hepatozoon* (apicomplexa: adeleina). J Parasitol 82:565–585.
311 <https://doi.org/10.2307/3283781>.

312 Telford SR Jr (2009) Hemoparasites of the Reptilia: color atlas and text. CRC Press, Boca Raton

313 Ujvari B, Madsen T, Olsson M (2004) High prevalence of *Hepatozoon* spp.(Apicomplexa, Hepatozoidae)
314 infection in water pythons (*Liasis fuscus*) from tropical Australia. J Parasitol 90:670–673.
315 <https://doi.org/10.1645/GE-204R>.

- 316 Viana LA, Soares P, Silva JE, Paiva F, Coutinho ME (2012) Anurans as paratenic hosts in the
317 transmission of *Hepatozoon caimani* to caimans *Caiman yacare* and *Caiman latirostris*. Parasitol
318 Res 110:883–886. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2570-6>.
- 319 Winemiller KO (1989) Ontogenetic diet shifts and resource partitioning among piscivorous fishes in the
320 Venezuelan ilanos. Environ Biol Fishes 26:177–199. <https://doi.org/10.1007/BF00004815>

9. CONCLUSÕES

- Serão encontrados parasitos do gênero *Haemogregarina* na circulação sanguínea de *Hoplias aimara*, de rios do estuario amapaense;
 - Não foram encontrados parasitos sanguíneos em *Hoplias aimara*
- Serão encontrados *Hepatozoon* sp. no fígado de *H. aimara*, de rios do estuario amapaense;
 - Foram encontrados cistos com cistozoitos de uma possível nova espécie de *Hepatozoon*, sugerindo uma possível função de *H. aimara* como hospedeiro paratênico deste parasito;
 - As análises filogenéticas baseadas em rDNA mostraram que o *Hepatozoon* encontrado em *H. aimara* apresentou similaridade elevada com sequências de *Hepatozoon caimani*, parasito dos crocodilianos *Caiman yacare* e *Caiman crocodilus*.

ANEXOS

ANEXO I - Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá
Protocolo no. 018/2019.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na data de 25 de junho de 2019, o parecer referente ao protocolo no. **018/2019** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Parasitos do Filo Apicomplexa nos peixes Arapaima gigas (Cuvier, 1817) e Hoplias lacerdae (Miranda Ribeiro, 1908) da Amazônia Oriental: caracterização morfológica e molecular**" coordenado por **Lúcio André Viana Dias**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting of June 25, 2019, the final decision about the Protocol **018/2019** and certify that the research project entitled "**Parasitos do Filo Apicomplexa nos peixes Arapaima gigas (Cuvier, 1817) e Hoplias lacerdae (Miranda Ribeiro, 1908) da Amazônia Oriental: caracterização morfológica e molecular**" coordinated by **Lúcio André Viana Dias**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 25 de junho de 2019

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José Carlos Tavares Carvalho'.

Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente CEUA-UNIFAP
Port. No. 1733/2014

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70296-2	Data da Emissão: 22/08/2019 09:11:18	Data da Revalidação*: 30/07/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Nome: Wagner Amanajás Cardoso	CPF: 617.464.602-53
Dados do titular Título do Projeto: Parasitos do Filo Apicomplexa nos peixes Arapaima gigas (Cuvier, 1817) e Hoplias lacerdae (Miranda Ribeiro, 1908) da Amazônia Oriental: caracterização morfológica e molecular	
Nome da Instituição: Fundação Universidade Federal do Amapá	CNPJ: 34.868.257/0001-81

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Caputara e coleta	08/2019	12/2020

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	JAMILLE KARINA COELHO CORREA	Colaborador	848.851.902-82	Brasileira
2	Pedro Hugo Esteves da Silva	Colaborador	552.257.642-15	Brasileira
3	Fabiane Rocha de Paula	Colaboradora	023.954.152-94	Brasileira

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0702960220190822

Página 1/4

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70296-2	Data da Emissão: 22/08/2019 09:11:18	Data da Revalidação*: 30/07/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Nome: Wagner Amanajás Cardoso	CPF: 617.464.602-53
Título do Projeto: Parasitos do Filo Apicomplexa nos peixes Arapaima gigas (Cuvier, 1817) e Hoplias lacerdae (Miranda Ribeiro, 1908) da Amazônia Oriental: caracterização morfológica e molecular	
Nome da Instituição: Fundação Universidade Federal do Amapá	CNPJ: 34.868.257/0001-81

Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, possessor ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Outras ressalvas

1	Na região do Cinturão Lacustre Oriental, no interior da Reserva Biológica do Lago Piratuba, os espécimes de Arapaima gigas deverão ser coletados apenas com arpão e no período de junho a novembro, em razão de termo de compromisso assinado com os moradores da Vila Sucuriju. Todas as carcaças de A. gigas deverão ser aproveitadas pelos pescadores cadastrados pelo Instituto Chico Mendes.	REBIO do Lago Piratuba
---	---	------------------------

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 70296-2	Data da Emissão: 22/08/2019 09:11:18	Data da Revalidação*: 30/07/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Nome: Wagner Amanajás Cardoso	CPF: 617.464.602-53
Título do Projeto: Parasitos do Filo Apicomplexa nos peixes Arapaima gigas (Cuvier, 1817) e Hoplias lacerdae (Miranda Ribeiro, 1908) da Amazônia Oriental: caracterização morfológica e molecular	
Nome da Instituição: Fundação Universidade Federal do Amapá	CNPJ: 34.868.257/0001-81

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Floresta Nacional do Amapá	AP	Amazônia	Não	Dentro de UC Federal
2	Oiapoque	Oiapoque-AP	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
3	Ferreira Gomes	Ferreira Gomes-AP	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
4	Cutias co Araguari	Cutias-AP	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
5	Mazagão	Mazagão-AP	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
6	Santana	Santana-AP	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
7	Reserva Biológica do Lago Piratuba	AP	Amazônia	Não	Dentro de UC Federal
8	Tartarugalzinho	Tartarugalzinho-AP	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual
9	Pracuúba	Pracuúba-AP	Amazônia	Não	Dentro de UC Estadual

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Hoplias lacerdae	-
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Hoplias lacerdae	30
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Arapaima gigas	-
4	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Arapaima gigas	30

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Peixes)	Fezes, Fragmento de tecido/órgão, Outras amostras biológicas(Fígado), Sangue
2	Método de captura/coleta (Peixes)	Anzol e linha (op.manual):linha de mão,de corso,carretilha,molinete,corrico,vara e isca viva, Arco e flecha, zagaia, fisga e variações

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	HELIXXA IMPORTAÇÃO, EXPORTAÇÃO E SERVIÇOS GENÔMICOS LTDA	Laboratório
2	Universidade Federal Rural da Amazônia	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº ACAB8EB

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **ACAB8EB**
Usuário: **WAGNER AMANAJAS CARDOSO**
CPF/CNPJ: **617.464.602-53**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Hepatozoon Hepatozoon indeterminado

Título da Atividade: **Parasitos do Filo Apicomplexa em Hoplias aimara (Valenciennes, 1847) de vida livre da Amazônia Oriental: caracterização morfológica e molecular**

Equipe

WAGNER AMANAJAS CARDOSO Unifap

Parceiras Nacionais

34.868.257/0001-81 / Fundação Universidade Federal do Amapá

Data do Cadastro: **10/06/2021 13:19:15**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **2:55 de 20/08/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**