

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Helmintos parasitos de *Proloricaria prolixa*
(Isbrücker & Nijssen, 1978) do Rio Pardo,
afluente do Rio Paranapanema, estado de São
Paulo**

Hugo Lago Rocha

Botucatu, SP

2025

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

Hugo Lago Rocha

Orientador: Professor Titular Reinaldo José da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Botucatu, SP

2025

R672h	Rocha, Hugo Lago Helmintos parasitos de Proloricaria proluxa (Isbrücker & Nijssen, 1978) do Rio Pardo, afluyente do Rio Paranapanema, estado de São Paulo / Hugo Lago Rocha. -- Botucatu, 2026 80 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu Orientador: Reinaldo José da Silva 1. Biodiversidade. 2. Taxonomia (Zoologia). 3. Invertebrados de água doce. 4. Cascudo (Peixe). I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Helminthos parasitos de Proloricaria proluxa (Isbrücker & Nijssen, 1978) do Rio Pardo, afluyente do Rio Paranapanema, estado de São Paulo

AUTOR: HUGO LAGO DE SANT'ANNA ROCHA

ORIENTADOR: REINALDO JOSÉ DA SILVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. REINALDO JOSÉ DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Biodiversidade e Bioestatística Setor de Parasitologia / Instituto de Biociências de Botucatu
Unesp

Prof. Dr. FABIO HIDEKI YAMADA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Regional do Cariri (URCA)

Pós-doutorando RODRIGO BRAVIN NARCISO (Participação Virtual)
Departamento de Hidrobiologia / Universidade Federal de São Carlos

Botucatu, 21 de agosto de 2025

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, especialmente minha mãe, Cristina, meu pai, Sidnei, meu padrasto, Flávio, minha madrasta, Noradi e meu irmão, Gabriel;

À minha esposa, Bárbara, por todos os anos de cumplicidade e afeto que dedicamos um ao outro;

Ao meu orientador, Prof. Tit. Reinaldo José da Silva, por compartilhar comigo seu conhecimento, tempo e paciência;

À Dra. Mariana Bertholdi Ebert, pelos ensinamentos e pela ajuda inestimável com a biologia molecular deste trabalho;

Aos meus colegas do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (LAPAS) e do Departamento de Parasitologia, pelo companheirismo e por todos os momentos em que ajudaram direta ou indiretamente com a produção deste trabalho;

Ao Jefferson Luan Crispim Rodrigues, pesquisador na área de sistemática e taxonomia de bagres neotropicais, pela ajuda na identificação taxonômica dos hospedeiros;

À população do município de Salto Grande, SP, por receberem nosso grupo de pesquisa durante as coletas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado CAPES 88887.798934/2022-00

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiar meu grupo de pesquisa com o auxílio de projeto FAPESP 2020/05412-9

RESUMO

Os helmintos parasitos de animais silvestres são importantes para a estabilidade dos ecossistemas. Eles podem ser valiosos indicadores da qualidade ambiental, desde que sejam identificados taxonomicamente e que suas relações ecológicas sejam conhecidas. Com esse propósito, 30 espécimes do peixe de água doce *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978), conhecido popularmente como “cascudo-chinelo”, foram coletados em um trecho do rio Pardo, próximo à foz, localizada no município de Salto Grande. Os peixes foram necropsiados e seus órgãos separados para coleta de parasitos. Os parasitos foram examinados em microscopia óptica e eletrônica para análise morfológica e morfométrica. Esta análise identificou um total de dez táxons, sendo três monopistocotilos: *Demidospermus spirophallus* Franceschini, Zago, Müller, Francisco, Takemoto & Silva, 2017, *Demidospermus prolixus* Franceschini, Zago, Müller, Francisco, Takemoto & Silva, 2017 e *Demidospermus* sp.; seis táxons de digenéticos, sendo dois adultos: *Creptotrema creptotrema* Travassos, Artigas & Pereira, 1928, *Halipeginae* gen. sp. Poche, 1926, e quatro metacercárias: *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928) Dubois, 1970, *Diplostomum* sp., *Diplostomidae* gen. sp. e *Tylodelphys* sp. Diesing, 1850; e um táxon de nematoide: *Rhabdochona acuminata* (Molin, 1860). Sete dos dez táxons relatados representam novidades quanto às relações de parasitismo com essa espécie hospedeira. *Demidospermus* sp. apresentou características morfológicas únicas nas barras dorsais e ventrais, sugerindo tratar-se de uma espécie ainda não descrita. O DNA extraído dos helmintos foi utilizado em análises moleculares que confirmaram o diagnóstico de *Demidospermus spirophallus* e de metacercárias de *Austrodiplostomum compactum* e *Diplostomidae* gen. sp.

Palavras-chave: Biodiversidade, Taxonomia (Zoologia), Monopisthocotyla, Trematoda, Nematoda

ABSTRACT

Helminth parasites of wild animals are important for ecosystem stability. They can be valuable indicators of environmental quality, provided that they are taxonomically identified and that their ecological relationships are known. For this purpose, 30 specimens of the freshwater fish *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978), locally known as “cascudo-chinelo”, were collected from a section of the Pardo river, near its mouth, located in the municipality of Salto Grande. The fish underwent necropsy and their organs were separated for parasite collection. The parasites were examined under optical and electron microscopy for morphological and morphometric analysis. This analysis identified a total of ten taxa, including three monopisthocotyleans: *Demidospermus spirophallus* Franceschini, Zago, Müller, Francisco, Takemoto & Silva, 2017, *Demidospermus prolixus* Franceschini, Zago, Müller, Francisco, Takemoto & Silva, 2017 and *Demidospermus* sp.; six digeneans, two of which were adults: *Creptotrema creptotrema* Travassos, Artigas & Pereira, 1928, Halipeginae gen. sp. Poche, 1926, and four metacercariae: *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928) Dubois, 1970, *Diplostomum* sp., Diplostomidae gen. sp. and *Tylodelphys* sp. Diesing, 1850; and one nematode taxon: *Rhabdochona acuminata* (Molin, 1860). Seven of the ten taxa represent new records for this host species. The unique morphological characteristics in the dorsal and ventral bars of *Demidospermus* sp. suggest a new, undescribed species. The DNA extracted from the helminths was used in molecular analyses that confirmed the diagnosis of *Demidospermus spirophallus* and of metacercariae of *Austrodiplostomum compactum* and Diplostomidae gen. sp.

Keywords: Biodiversity, Taxonomy (Zoology), Monopisthocotyla, Trematoda, Nematoda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. O que é um parasito?	9
1.2. Parasito ou parasita?	9
1.3. Biodiversidade de parasitos	10
1.4. Taxonomia de helmintos	11
1.4.1. Filo Nematoda.....	13
1.4.2. Filo Acanthocephala.....	14
1.4.3. Classe Cestoda	15
1.4.4. Classe Trematoda.....	16
1.4.5. Classes Monopisthocotyla e Polyopisthocotyla.....	18
1.5. A localidade: rio Pardo, bacia do Paranapanema	21
1.6. O hospedeiro: <i>Proloricaria prolixa</i> (Isbrücker & Nijssen, 1978)	23
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Coleta dos hospedeiros	26
3.2. Identificação morfológica dos hospedeiros.....	27
3.3. Necropsia, coleta dos parasitos e identificação.....	28
3.4. Extração de DNA genômico e PCR.....	29
3.5. Sequenciamento e reconstrução filogenética	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Helmintos coletados	30
4.2. Descrição morfológica dos helmintos	32
4.3. Análises de filogenia molecular	56
5. DISCUSSÃO	62
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
7. REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. O que é um parasito?

Parasito era a palavra usada na Grécia antiga para se referir às pessoas que eram hospedadas no pritaneu, um tipo de prédio público que recebia magistrados, diplomatas e outras figuras importantes. Como o pritaneu era o local de encontro dessas pessoas, e continha alojamentos e refeitório para elas, essas pessoas passaram a ser chamadas de parasitos (para = ao lado; sito = trigo, grão ou alimento; parasito = aquele que come ao lado), cujo significado original era bastante similar ao de comensal ou inquilino e não era necessariamente usado de maneira pejorativa. Ao longo do tempo, essa palavra foi adquirindo a conotação negativa de alguém que reside e se alimenta às custas dos outros (De Rezende, 1999).

As ciências biológicas usam o termo parasitismo para descrever a relação ecológica entre hospedeiro e parasito. O parasitismo é uma interação ecológica entre dois organismos em que um é prejudicado e o outro se beneficia. O parasito é o organismo que se beneficia do parasitismo, causando algum tipo de prejuízo para o hospedeiro, sem necessariamente matá-lo. Essa é uma definição bastante abrangente que em alguns casos pode se confundir com outras relações ecológicas como a micropredação e o comensalismo. Como não existe um consenso estabelecido sobre a melhor definição de parasitismo, existem múltiplas versões mais específicas que podem ser conflitantes entre si. De uma maneira geral, os parasitos costumam ser menores que o hospedeiro, vivem aderidos a ele ou dentro dele e possuem uma relação de dependência metabólica com ele (Goater *et al.*, 2014).

1.2. Parasito ou parasita?

No Brasil, o termo “parasito” raramente é usado na linguagem popular, sendo mais comum usar a variante “parasita”. No entanto, a variante “parasito” é mais comum na linguagem científica, já que seu uso é defendido por uma parte dos pesquisadores (De Rezende, 1999). Esses pesquisadores sugerem o uso de “parasito” enquanto substantivo, como em “foram coletados dez parasitos dos olhos do hospedeiro” e que a forma “parasita” só deve ser usada como adjetivo feminino ou ao conjugar o verbo “parasitar”, como em “as espécies parasitas” e “esse verme parasita elefantes”. Por esse motivo, o

presente estudo adotará o substantivo masculino “parasito” para se referir a este grupo de organismos.

1.3. Biodiversidade de parasitos

A biodiversidade ou diversidade biológica refere-se à variedade de seres vivos no planeta Terra, incluindo também os ecossistemas e processos ecológicos em que esses seres vivos estão envolvidos (Prado e Lewinsohn, 2002). As perdas de biodiversidade causadas por ações humanas como poluição ambiental, introdução de espécies invasoras, destruição de habitats e mudanças climáticas ampliaram a preocupação global com a preservação ecológica. Embora a sociedade se mobilize para impedir o desaparecimento de espécies de maior visibilidade, a taxonomia, ciência que estuda a biodiversidade e fundamenta esses esforços, permanece subestimada. Mesmo com a crescente necessidade de catalogar e proteger espécies, a formação de taxonomistas está em declínio e a área enfrenta falta de financiamento e reconhecimento acadêmico (Drew, 2011). Essa subvalorização é ainda mais evidente no estudo de parasitos, cuja pesquisa taxonômica tem sido especialmente escassa (Brooks e Hoberg, 2001; Poulin e Morand, 2004), apesar do grande potencial para descrição de novas espécies.

Os parasitos provocam uma resposta natural de repulsa nas pessoas e costumam vistos como um incômodo a ser eliminado, fazendo com que o mapeamento da diversidade de parasitos seja encarado como uma tarefa desnecessária, mas na verdade, os parasitos são uma grande porção da biodiversidade de todos os ecossistemas, tanto em número de espécies quanto em biomassa. Estima-se que 30% a 50% de todas as espécies sejam parasitas (Lymbery e Smit, 2023). Além de comporem uma grande parcela da biodiversidade, esses seres desempenham um papel essencial nas redes tróficas e, ao estudá-los, os pesquisadores da biodiversidade estão produzindo dados de grande valor. Em regiões que mapearam a fauna parasitária local, os parasitos são excelentes indicadores de qualidade ambiental (MacKenzie *et al.*, 1995), já que alguns deles têm ciclos de vida altamente dependentes das relações interespecíficas dos hospedeiros, exibem parâmetros mensuráveis das relações de parasitismo, como prevalência, intensidade e abundância e costumam ser especialmente sensíveis às perturbações ambientais. Um exemplo de parasito particularmente afetado por perturbações ambientais são os helmintos monopistocotilos, grupo em que quase todas as espécies são ectoparasitas de peixes, muitas delas vivendo protegidas do contato físico direto com o

ambiente externo por estarem ancoradas às brânquias dos peixes, mas ainda expostas ao meio aquático externo e a quaisquer mudanças de temperatura, pH, oxigenação e possíveis poluentes encontrados na água. Embora o conceito de vulnerabilidade ambiental ainda não esteja bem estabelecido entre os pesquisadores, é razoável supor que os ambientes marinhos e dulcícolas, altamente expostos a perturbações ambientais e com baixa capacidade de se adaptar a elas sejam considerados ambientes vulneráveis (Logez *et al.*, 2025).

Nos ambientes aquáticos encontram-se os vertebrados com a maior diversidade e quantidade de parasitos: os peixes. A história evolutiva dos peixes envolve uma longa relação com os meios aquáticos, que possibilitou o estabelecimento de uma grande variedade de relações de parasitismo. Se um corpo d'água tem uma alta diversidade de espécies de peixes, existe uma grande chance de que tenha uma diversidade ainda maior de espécies de parasitos de peixes. O Brasil se encontra na região zoogeográfica neotropical, aquela com a maior diversidade de espécies de peixe de água doce no mundo, contabilizando cerca de 7.000 espécies (Albert e Reis, 2011), sendo que 3.631 ocorrem atualmente em ambientes de água doce do Brasil (Froese e Pauly, 2024). Essa diversidade de peixes das águas continentais está relacionada a uma série de mecanismos tais como, funcionamento e dinâmica de rios, lagos, áreas alagadas, represas, e principalmente do ciclo hidrológico (Tundisi *et al.*, 2006). Neste contexto, proporcionalmente à diversidade de peixes de água doce, a de parasitos de peixes também é bastante expressiva no Brasil (Eiras *et al.*, 2010), entretanto pouco dessa riqueza foi explorada até o presente (Eiras *et al.*, 2011).

A exposição do ambiente dulcícola a perturbações ambientais de difícil adaptação e a possibilidade de mensurar o efeito dessas perturbações através do parasitismo em ambientes com mapeamento de fauna parasitária são uma nova e importante justificativa para o registro da biodiversidade de parasitos no ambiente de água doce. Adicionalmente, a grande quantidade e variedade de parasitos que podem ser encontrados nos peixes e a alta diversidade de peixes dulcícolas no Brasil tornam os rios brasileiros localidades muito valiosas para a pesquisa de taxonomia de parasitos.

1.4. Taxonomia de helmintos

Taxonomia é a ciência responsável por identificar os seres vivos, nomeá-los e organizá-los em categorias hierárquicas baseadas em sua origem evolutiva. Um conceito

fundamental da taxonomia são os táxons, também chamados de níveis taxonômicos. Os principais níveis taxonômicos, do mais abrangente para o mais específico, são: reino, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie. A taxonomia dita que um táxon precisa ser monofilético para ser considerado válido. Um grupo monofilético é aquele que contém todos os membros de uma linhagem evolutiva e nenhum membro de fora desta linhagem. Um grupo formado exclusivamente por todos os animais de sangue quente que andam em duas pernas seria um grupo não monofilético, já que a endotermia e o bipedalismo do ser humano evoluíram separadamente da endotermia e bipedalismo das aves, por exemplo. A classificação dos seres vivos em grupos monofiléticos representa corretamente a história evolutiva deles. Apesar da monofilia ser obrigatória para considerar um grupo válido, alguns grupos não naturais de importância histórica são usados de maneira pragmática pelos pesquisadores devido à sua praticidade. Os peixes são um desses grupos, já que a palavra peixe é usada para se referir a todos os grupos de animais vertebrados excluindo uma única linhagem, a dos tetrápodes (anfíbios, mamíferos, aves e répteis). Esse tipo de agrupamento não natural em que a exclusão de uma linhagem torna o grupo não-monofilético é chamada de parafilia. Além da parafilia, existe outro tipo de agrupamento não natural, a polifilia, em que diferentes linhagens são reunidas artificialmente. Um bom exemplo de grupo polifilético usado pragmaticamente são os helmintos.

Helminto é a palavra usada pelos pesquisadores para se referir aos animais conhecidos popularmente como vermes. Os helmintos são um grupo polifilético porque contém seres de diversas linhagens, mas que compartilham entre si muitas características de importância taxonômica. Os pesquisadores usam o termo helmintos para se referir aos grupos de animais invertebrados de corpo mole e alongado, de simetria bilateral, desprovidos de apêndices articulados e sem celoma verdadeiro (cavidade corporal revestida por mesoderme). Apesar da forte percepção que associa os helmintos à vida parasitária, apenas alguns grupos, como os cestóides, acantocéfalos, monopistocótilos e poliopistocótilos, são formados exclusivamente por parasitos e alguns grupos, como os nematóides, possuem mais espécies de vida livre que parasitos. Dentre os grupos de helmintos, aqueles que contém espécies conhecidas de parasitos de peixes são: os filos Nematoda e Acanthocephala, e as classes Cestoda, Trematoda, Monopisthocotyla e Poliopisthocotyla.

1.4.1. Filo Nematoda

Os nematoides, cujo nome vem do grego “nema” (fio), são vermes cilíndricos e alongados, com corpo não segmentado e revestido por uma cutícula resistente. Possuem sistema digestório completo e são dioicos, ou seja, são divididos em machos e fêmeas, embora existam algumas espécies em que ocorre hermafroditismo e partenogênese. Possuem pseudoceloma, uma cavidade corporal não revestida por mesoderme, que atua como o esqueleto hidrostático desses animais. Não possuem sistema circulatório nem órgãos respiratórios.

O revestimento externo do corpo dos nematoides é resistente e flexível, composto de múltiplas camadas diferenciadas: a camada mais externa, a epicutícula, é acelular e lipídica; seguida por outra camada acelular, a cutícula, uma matriz proteica extracelular formada por fibrilas entrelaçadas de colágeno; a cutícula é secretada pelo tecido celular epitelial abaixo dela, a epiderme; abaixo da epiderme, existe uma membrana basal a qual se conectam as fibras musculares estriadas inervadas pelos nervos dorsal, ventral e pelos nervos laterais. Todos os nematoides passam por mudança de pele (ecdise) quatro vezes, processo em que uma camada externa da cutícula é substituída por uma nova camada sintetizada abaixo dela. A última ecdise resulta no fim do estágio larval e começo da fase adulta.

O sistema digestório dos nematoides é composto por boca, faringe, esôfago, intestino e ânus/cloaca, podendo também conter uma variedade de estruturas como cápsula bucal esclerotizada, vestibulo, prostômio, bulbo esofágico, esôfago dividido em partes muscular e glandular, cecos intestinais e esofágicos. A quantidade de lábios e dentes varia conforme cada espécie. Possuem um órgão nervoso central, o anel nervoso, circunferente ao esôfago. Dioicos e sexualmente dimórficos: os machos costumam ser menores que as fêmeas e dotados de estruturas na região posterior cuja função é facilitar a cópula.

Os helmintos do filo Nematoda contém uma grande variedade de papéis ecológicos: muitos são animais de vida livre, vivendo no solo de ambientes terrestres ou no substrato de ambientes marinhos ou de água doce, se alimentando de detritos ou predando outros seres vivos, enquanto outros nematoides se adaptaram ao parasitismo de plantas ou animais. Os nematoides parasitos de animais são, de maneira geral, endoparasitos, encontrados no sistema digestório, respiratório, circulatório e nos músculos, incluindo o coração (Rey, 2008; Goater, 2014). Há menos de trinta anos, foi

estimado que 40% dos nematoides descritos eram parasitos e que 92% desses parasitos infectavam animais vertebrados (Moravec, 1998). Caso essa proporção se mantenha na atualidade, teremos 9.200 nematoides parasitos de vertebrados dentro de um total de 25.000 espécies (Zhang, 2013).

1.4.2. Filo Acanthocephala

O nome Acanthocephala surge a partir das palavras gregas para espinho e cabeça, e foi escolhido para descrever um grupo relativamente pequeno de helmintos, possuindo cerca de 1.100 espécies descritas (Goater *et al.*, 2014). Os acantocéfalos são endoparasitos obrigatórios, e as formas adultas geralmente infectam os intestinos de animais vertebrados.

Os acantocéfalos recebem esse nome em alusão ao órgão que usam para se fixar ao hospedeiro, uma probóscide retrátil coberta de espinhos que possuem na região anterior do corpo. O corpo desses helmintos costuma ter o formato de um tubo que se estreita nas extremidades. Não possuem sistema digestório, absorvendo nutrientes através do tegumento, como fazem os cestoides. Assim como os nematoides, são pseudocelomados, dioicos e sexualmente dimórficos, tendo fêmeas maiores que os machos. Os machos possuem um par de testículos (ou um único testículo, em casos raros) cada testículo conectado a um vaso eferente que conduz os espermatozoides ao vaso deferente e/ou pênis, além de dois órgãos acessórios: a bursa copulatória e as glândulas de cimento. A bursa copulatória é usada pelo macho para segurar a fêmea durante a cópula, enquanto as glândulas de cimento secretam o cimento copulatório, formando um tampão que impede que o esperma escape do corpo da fêmea, ao mesmo tempo que impossibilita temporariamente que outro macho se reproduza com ela. O sistema reprodutor da fêmea é composto de um ovário (que costuma se fragmentar em esferas ovarianas), uma campânula uterina, um útero e uma vagina (Borchert, 1964; Goater *et al.*, 2014; Davidenko e Nishikin, 2024).

Os acantocéfalos regulam a eversão e retração de estruturas especializadas, como a probóscide e a bursa copulatória, por meio de seu sistema lacunar. Este sistema consiste em uma rede de canais preenchidos por fluido que, sob ação de fibras musculares, atua como um mecanismo hidrostático, gerando pressão hidráulica para controle dessas estruturas.

1.4.3. Classe Cestoda

Os cestoides, cujo nome deriva do grego "kestos" (fita), são o grupo que contém os helmintos de formato achatado e alongado, similares a uma fita. Esse formato de fita é notável nas espécies da subclasse Eucestoda, e não se aplica tanto às espécies da subclasse Cestodaria, mas existem características importantes que evidenciam a relação entre esses clados irmãos e justificam a inclusão de ambos na Classe Cestoda, como a ausência de cavidade celomática, a fisiologia profundamente adaptada para o endoparasitismo obrigatório (durante a fase adulta), a substituição do sistema digestório por um tegumento especializado em absorver nutrientes do hospedeiro, e a ocorrência de hermafroditismo verdadeiro em quase todas as espécies. Apesar dessas semelhanças, a diferença morfológica entre esses animais é evidente: todos os eucestoides tem o corpo segmentado, em alguns casos possuindo milhares de segmentos, enquanto os cestodários são desprovidos de qualquer segmentação.

Classe Cestoda - Subclasse Cestodaria

Os helmintos da subclasse Cestodaria, divididos nas ordens Amphilinidea e Gyrocotylidea, apresentam uma organização corporal mais simples e sem segmentação. Estes vermes não possuem o típico escólex dos eucestoides, utilizando outras estruturas para sua fixação. Os Amphilinidea, como a espécie *Amphilina foliacea*, parasitam cavidades corporais de peixes como esturjões, apresentando um corpo foliáceo que se fixa através de uma extremidade anterior modificada. Seu ciclo de vida é notavelmente mais simples, muitas vezes dispensando hospedeiros intermediários, com ovos que eclodem na água liberando larvas capazes de infectar diretamente os peixes. Já os Gyrocotylidea, exemplificados por *Gyrocotyle urna*, são encontrados no intestino de peixes cartilagosos, apresentando uma extremidade posterior em forma de disco ou funil para fixação, sendo seu ciclo de vida ainda pouco compreendido, mas presumivelmente direto.

Classe Cestoda - Subclasse Eucestoda

A etimologia do nome Eucestoda ("eu" = verdadeiro; "kestos" = fita) revela que esse grupo de animais é aquele que dá nome à classe Cestoda. Como seu nome sugere, são helmintos de formato achatado e muito longo, lembrando uma fita. Seu corpo é composto por três partes: a primeira é o escólex, a porção mais anterior do corpo dos

Eucestoda adultos. Cada eucestoide possui um único escólex (salvo raras exceções) que utiliza para a ancoragem nos tecidos do hospedeiro. O escólex é equipado com uma variedade de estruturas diferentes para cada espécie, como rostelos, acetábulos, ventosas, ganchos, espinhos, botrias e botrídeos; a segunda parte é o colo. Cada eucestoide também possui um único colo. É a parte do corpo que contém uma grande quantidade de células tronco indiferenciadas, usadas para produzir a terceira parte do corpo; a terceira parte é constituída de proglotes, que são uma fileira de unidades repetitivas que formam a porção posterior do corpo. Normalmente, cada proglote contém um conjunto completo de órgãos reprodutivos masculinos e femininos.

O hermafroditismo, presente em quase todos os eucestoides, lhes confere capacidades reprodutivas notáveis, permitindo tanto a fecundação cruzada quanto a autofecundação, embora a ocorrência de autofecundação seja limitada, em muitas espécies, pelos diferentes períodos de maturidade sexual para os órgãos sexuais masculinos e femininos. O ciclo de vida desses organismos geralmente envolve um ou mais hospedeiros intermediários, no qual as formas larvais se desenvolvem antes de alcançar a maturidade no hospedeiro definitivo. Os hospedeiros dos eucestoides são predominantemente animais vertebrados.

1.4.4. Classe Trematoda

O nome Trematoda (do grego “trematodes” = perfurado) refere-se à principal estrutura de fixação deste grupo de animais, as ventosas. Os corpos dos trematódeos são achatados e foliáceos ou alongados. A maioria das espécies são monoicas, com uma exceção importante nas espécies da família Schistosomatidae, que são dioicas e sexualmente dimórficas. Os trematódeos são divididos nas subclasses Digenea, de ciclo de vida complexo e ventosas simples e Aspidogastrea, de ciclo de vida mais simples e ventosas fundidas em um disco ventral septado. A maioria dos trematódeos é endoparasito na fase adulta, alguns tem uma fase larval de vida livre. Quase todos os digenéticos têm um molusco como hospedeiro em alguma parte da vida, em muitos casos atuando como hospedeiro intermediário que precede um hospedeiro definitivo vertebrado (Gibson, 2002).

Classe Trematoda - Subclasse Digenea

Os trematódeos digenéticos, cujo nome deriva dos termos “di” (duas) e “genesis” (origem), referindo-se ao seu ciclo de vida envolvendo dois ou mais hospedeiros, são helmintos achatados dorsoventralmente de maneira geral, com corpo foliáceo ou alongado. Diferentemente dos nematóides, acantocéfalos e cestóides, os trematódeos possuem um sistema digestivo incompleto, com uma boca muscular seguida por uma pré-faringe (somente em algumas espécies), faringe, esôfago e um intestino bifurcado que se estende pelo corpo, mas sem ânus. Uma estrutura marcante desses parasitos é a presença de ventosas de fixação – uma oral, associada à boca, e outra ventral – que garantem adesão aos tecidos do hospedeiro.

Os trematódeos exibem adaptações morfológicas e fisiológicas extremamente especializadas para o parasitismo obrigatório. Seu tegumento é sincicial e altamente ativo metabolicamente, permitindo a absorção de nutrientes e a troca de gases, além de oferecer proteção contra as defesas do hospedeiro. A maioria das espécies é hermafrodita, com sistemas reprodutores masculino e feminino complexos, embora existam grupos (como as espécies de Schistosomatidae) que apresentam sexos separados (dioicos). A reprodução pode envolver autofecundação ou fecundação cruzada, dependendo da disponibilidade de parceiros.

O ciclo de vida desses parasitos é heteroxênico, envolvendo estágios larvais que se desenvolvem em um ou mais hospedeiros intermediários (geralmente moluscos) antes de infectarem o hospedeiro definitivo, que em sua maioria são vertebrados. As larvas passam por várias transformações, incluindo estágios de miracídio, esporocisto, rédia, cercária e metacercária, demonstrando uma complexa alternância de gerações e estratégias de transmissão.

Classe Trematoda - Subclasse Aspidogastrea

A subclasse Aspidogastrea representa um grupo pequeno de cerca de 80 espécies, cujo nome reflete sua característica mais distintiva: um grande disco adesivo ventral que lembra um escudo (do grego *aspis*, "escudo", e *gaster*, "ventre"). Essa estrutura ventral ampla e segmentada é uma forma derivada do conjunto de ventosas visto em outros trematódeos, e assim como elas, funciona como um órgão de adesão. Essa ventosa modificada ocupa grande parte do corpo e contrasta com as ventosas separadas dos trematódeos digenéticos. Outra diferença marcante é a ausência de ventosa oral, sendo a fixação realizada exclusivamente pelo disco posterior. Assim como os digenéticos, possuem um sistema digestório incompleto, formado por um tubo digestivo simples e

terminado em um fundo cego. Os aspidogastrídeos têm uma riqueza de células nervosas na região anterior do corpo ligada a uma rede de nervos em formato de escada, formando um sistema nervoso complexo em relação a outros grupos de helmintos parasitos.

O ciclo de vida dos aspidogastrídeos é notavelmente mais simples que o dos digenéticos. Enquanto estes últimos exigem hospedeiros intermediários e definitivos, muitas espécies de aspidogastrídeos completam seu desenvolvimento em um único hospedeiro, geralmente moluscos bivalves ou gastrópodes. Algumas espécies, porém, utilizam um segundo hospedeiro vertebrado pecilotérmico (como peixes ou tartarugas) de forma facultativa, sem a dependência obrigatória vista nos digenéticos. A infecção por aspidogastrídeos é considerada pouco patogênica. Esses helmintos não exibem alta especificidade para seus hospedeiros, sejam moluscos ou vertebrados. As larvas são liberadas na água e infectam novos hospedeiros diretamente, sem estágios larvais complexos como cercárias ou metacercárias.

1.4.5. Classes Monopisthocotyla e Polyopisthocotyla

A antiga classe Monogenea teve sua monofilia contestada com base em evidência molecular (Brabec *et al.*, 2023) levando à proposição da elevação das suas subclasses Monopisthocotylea e Poliopisthocotylea ao nível de classe. Apesar da recente evidência de origem evolutiva separada, os helmintos de ambas as classes recém propostas têm ciclos de vida e morfologia muito semelhantes, já que ambos são platelmintos acelomados de sistema digestório incompleto, ectoparasitos, hermafroditas, de vida livre na fase larval e com um único hospedeiro, na fase adulta. Os dois grupos diferem morfologicamente pelo tipo de estruturas encontradas no opistoháptor, o segmento posterior do corpo usado para fixação no hospedeiro.

Classe Monopisthocotyla

Helmintos de corpo achatado dorsoventralmente, acelomados, de sistema digestório incompleto composto por boca, pré-faringe, faringe, esôfago e um par de cecos intestinais que podem ou não se fundir posteriormente. São animais monoicos: cada organismo é hermafrodita e possui um sistema reprodutor feminino e masculino. Corpo formado por cabeça, tronco, pedúnculo e háptor (também chamado de opistoháptor), uma estrutura de fixação. Na região da cabeça, também chamada de proháptor, costumam ser encontradas a boca, a pré-faringe e a faringe, além de um conjunto de glândulas secretoras

de material adesivo chamadas glândulas cefálicas e um conjunto de células sensíveis a luz chamadas de manchas ocelares. É comum que as manchas ocelares sejam aglomeradas em quatro estruturas análogas a olhos, chamadas de ocelos. Diferentemente dos digenéticos, que possuem uma bexiga e um poro excretor, os monopistocotilos têm um par de bexigas e poros excretores localizados na região anterior. No tronco, encontram-se os cecos intestinais e os órgãos reprodutivos. O pedúnculo conecta o tronco ao háptor. O háptor é responsável pela fixação do monopistocotilo ao hospedeiro. A maioria das espécies é dotada de estruturas esclerotizadas de grande importância taxonômica, como um par de barras, dois pares de âncoras, e uma quantidade pares de ganchos que varia conforme a espécie.

Apesar do hermafroditismo, a autofecundação costuma ser minimizada em muitas espécies pela ausência de comunicação interna entre os sistemas reprodutores masculinos e femininos. A quantidade de testículos varia conforme a espécie, podendo ter entre um e uma centena de testículos, embora a maioria tenha um par deles (Goater *et al.*, 2014). Cada testículo se conecta ao ducto ejacutório através de um vaso eferente. Em muitas espécies, o ducto ejacutório é equipado com um órgão copulatório análogo ao pênis chamado de cirro. Também é comum a presença de estruturas esclerotizadas envolvidas no processo de cópula.

O sistema reprodutor feminino possui um único ovário, que produz os oócitos, que seguem através do oviduto para o oótipo, uma câmara especializada na formação dos ovos. O oótipo é uma estrutura importante, associada às glândulas vitelinas e à glândula de Mehlis, que contribuem com os nutrientes necessários para o desenvolvimento embrionário e lubrificam o oótipo, respectivamente. Após a formação no oótipo, os ovos passam pelo útero, um ducto que os transporta em direção ao poro genital feminino, ou poro genital comum, nos casos de espécies com comunicação entre os sistemas reprodutores masculino e feminino. Em algumas espécies, o útero pode se expandir para armazenar ovos antes da liberação.

O sistema feminino também pode incluir um canal vaginal, presente em certos grupos, que recebe o esperma durante a cópula cruzada, embora em muitos monopistocotilos a fertilização ocorra internamente, com o esperma sendo transferido diretamente para o oviduto ou oótipo. Em algumas espécies existe uma conexão entre o sistema reprodutor e o sistema digestório chamado canal genitointestinal. Acredita-se que o canal genitointestinal seja o vestígio de um órgão que permitia ao ancestral dos monopistocotilos modernos depositar os ovos no intestino e expeli-los pela boca.

Os monopistocotilos têm ciclo de vida direto, iniciando como ovo, do qual surge uma forma larval ciliada de vida livre chamada oncomiracídio. Os oncomiracídios possuem um conjunto de ganchos na região posterior, que são usados para se fixar ao hospedeiro para dar início à fase adulta. Os ganchos do oncomiracídio são a mesma estrutura que os ganchos do háptor do monopistocotilo adulto. As espécies da família Gyrodactylidae são vivíparas e não apresentam a fase da larva de vida livre, em vez disso, as larvas se desenvolvem no útero e nascem na forma de adultos juvenis, já grávidas com juvenis também grávidas.

Os monopistocotilos são, exceto por raríssimas exceções, ectoparasitos de peixes, sendo encontrados ancorados às brânquias, pele, boca, narinas e ânus do hospedeiro. As brânquias são o sítio de parasitismo mais comum, devido à localização protegida que as brânquias oferecem e o suprimento abundante de muco, dos quais os monopistocotilos se alimentam.

Classe Polyopisthocotyla

Helmintos achatados dorsoventralmente, acelomados, com sistema digestório incompleto semelhante aos Monopisthocotyla (boca, pré-faringe, faringe muscular, esôfago e cecos intestinais), porém frequentemente com ramificações intestinais mais complexas. Como todos os Neodermata, são hermafroditas, mas apresentam diferenças marcantes na morfologia do háptor e na biologia reprodutiva quando comparados aos Monopisthocotyla.

O corpo é dividido em cabeça (proháptor), tronco e opistoháptor. Diferentemente dos Monopisthocotyla, que possuem háptor armado com ganchos e âncoras - os poliopistocotilos desenvolveram um háptor com múltiplas ventosas ou grampos (*clamps*) esclerotizados (tipicamente 2-8 pares), estruturas mais adequadas para fixação em superfícies branquiais. Estes grampos podem apresentar mecanismos de articulação complexos, com escleritos interconectados formando estruturas semelhantes a pinças.

O sistema reprodutor masculino geralmente apresenta um único testículo (diferente dos múltiplos testículos em muitos Monopisthocotyla). Assim como os monopistocotilos, também possuem cirro. O sistema feminino inclui um ovário único, oótipo com a glândula de Mehlis, mas difere na organização dos ductos vitelinos, que formam um padrão reticulado característico. A fecundação é tipicamente cruzada, com transferência de espermatozoides através de cirro ou canal vaginal quando presente.

Assim como os monopistocotilos, possuem desenvolvimento direto com estágio larval oncomirácidio ciliado, porém a larva apresenta morfologia do háptor já prefigurando a estrutura adulta (com primórdios de grampos). O desenvolvimento é geralmente mais lento que em Monopisthocotyla.

Quase todos são ectoparasitos branquiais de peixes, com alguns casos de parasitismo em bexiga urinária de anfíbios e mucosa nasal de répteis marinhos. Enquanto os monopistocotilos se alimentam predominantemente de epitélio ou muco, os poliopistocotilos desenvolveram adaptações para a hematofagia, como: faringe equipada com enzimas anticoagulantes, cecos intestinais altamente ramificados para armazenamento sanguíneo.

1.5. A localidade: rio Pardo, bacia do Paranapanema

O rio Pardo encontra-se em uma região de clima mesotérmico, caracterizada por um verão com chuvas intensas e inverno seco, temperaturas amenas (média anual em torno de 20°C) e o índice pluviométrico entre 1.100 e 1.700 mm anuais (Grossi, 2003). A vegetação nativa é característica da Mata Atlântica do Interior, denominada de Floresta Estacional Semidecidual (Peron & Piroli, 2011).

A nascente do rio Pardo encontra-se na serra de Botucatu, entre os municípios paulistas de Botucatu e Pardinho (**Figura 1**). Durante o seu percurso, o rio Pardo e seus afluentes transpassam as áreas urbanas de vários municípios paulistas: Botucatu, Itatinga, Pratânia, Avaré, Cerqueira César, Iaras, Águas de Santa Bárbara, Óleo, Manduri, Bernardino de Campos, Santa Cruz do rio Pardo, Chavantes, Canitar e Ourinhos (Peron & Piroli, 2011). Seu curso segue até desaguar no trecho médio do rio Paranapanema, no Município de Salto Grande. O Paranapanema, que divide os estados de São Paulo e Paraná, é um importante afluente da bacia do alto rio Paraná.

Na bacia do Paranapanema foram registradas 225 espécies de peixes, sendo 165 nativas e 60 não nativas. A família com a maior diversidade de espécies na bacia foi Loricariidae, com um total de 39 espécies (32 nativas e 7 não nativas), seguida de Characidae (33 espécies) e Cichlidae (20 espécies). As ordens mais diversas também foram aquelas que continham essas três famílias: Siluriformes, Characiformes e Cichliformes, respectivamente. Esse padrão reflete o que tem sido observado em outras áreas bem amostradas da região Neotropical, onde essas famílias estão entre as mais diversas (Bertaco *et al.*, 2016). As bacias dos trechos alto, médio e baixo apresentaram

valores diferentes de diversidade de espécies entre si (**Figura 2**) (Jarduli *et al.*, 2020). O rio Pardo é um dos principais rios tributários do médio Paranapanema, onde foram registradas 103 espécies de peixes nativos e 27 não nativos. Somente no Reservatório de Salto Grande, onde deságua o Pardo, são registradas 75 espécies nativas (Jarduli *et al.*, 2020).

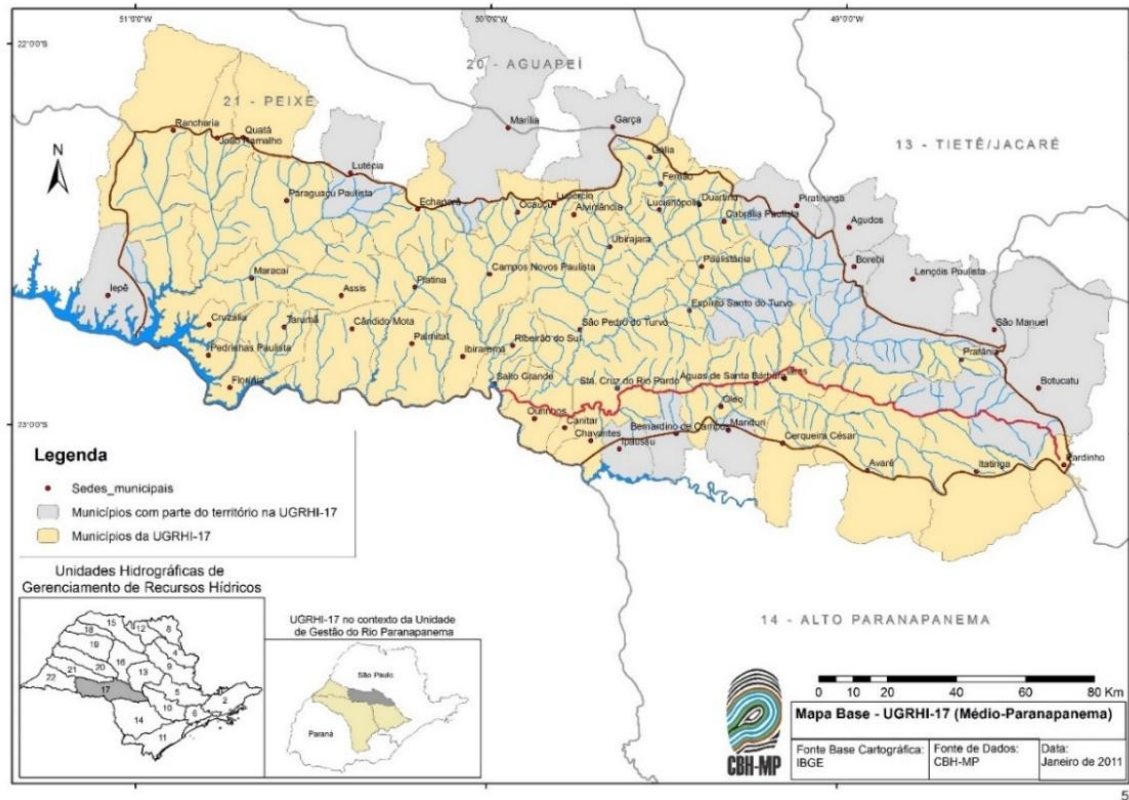


Figura 1. Rio Pardo (em vermelho), médio rio Paranapanema, São Paulo. Fonte: CBH-MP, 2007.

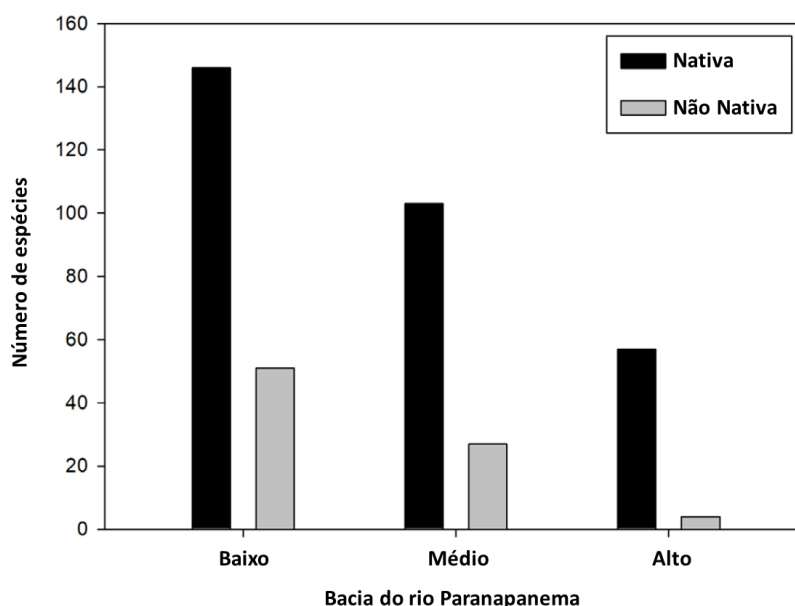


Figura 2. Riqueza de espécies separadas em peixes nativos e não nativos no bacia do rio Paranapanema (adaptado de Jarduli *et al.*, 2020).

1.6. O hospedeiro: *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978)

Família Loricariidae (Peixes-cascudos)

Os bagres (ordem Siluriformes) da família Loricariidae correspondem aos peixes conhecidos popularmente como peixes-cascudos, notáveis por seu corpo recoberto por uma “armadura” de placas ósseas e boca em forma de ventosa localizada na parte inferior da cabeça, adaptada para o estilo de vida bentônico e a alimentação detritívora da maioria das espécies (Salvador-Júnior *et al.*, 2009). Os loricarídeos são naturais da região neotropical, ou seja, são encontrados na América do Sul e Central, embora sejam encontrados como espécies invasoras em outras regiões. São a família mais diversa da ordem Siluriformes, com 673 espécies distribuídas em 100 gêneros. Das 39 espécies de loricarídeos da bacia do Paranapanema, 20 (18 nativas + 2 não nativas) foram relatadas na bacia do trecho médio (Jarduli *et al.*, 2020), onde se encontra o rio Pardo. O hábito bentônico e a dieta detritívora desses peixes facilitam a infecção por helmintos com ciclos de vida complexos, principalmente em ambientes lânticos, onde moluscos gastrópodes (os primeiros hospedeiros intermediários dos trematódeos) são abundantes.

Proloricaria prolixa (cascudo-chinelo)

Uma das espécies de loricarídeos nativas do rio Pardo, *Proloricaria prolixa* (Figura 3), é um peixe de corpo achatado dorsoventralmente, coloração castanha com

manchas escuras arredondadas e comprimento padrão de 4,4 a 4,8 vezes o comprimento da cabeça (Ota *et al.*, 2018), e é conhecido popularmente como cascudo-chinelo. A validade taxonômica desta espécie foi muito questionada: em algumas ocasiões o gênero *Proloricaria* Isbrücker, 2001 do qual *P. prolixa* é a espécie tipo, foi rejeitado e a espécie foi identificada por seu protônimo: *Loricaria prolixa* Isbrücker & Nijssen, 1978; outra questão é a existência de uma espécie congênere que também é encontrada na bacia do Alto Paraná (Dagosta *et al.*, 2024): *Proloricaria lentiginosa* Isbrücker, 1979, que foi descrita originalmente como uma subespécie de *P. prolixa* sob o protônimo *Loricaria prolixa lentiginosa* Isbrücker 1979 (Covain *et al.*, 2016; Pinheiro, 2023). O presente trabalho irá tratar como válido o gênero *Proloricaria* e suas espécies *Proloricaria prolixa* e *Proloricaria lentiginosa*, de acordo com a revalidação proposta por Covain *et al.* (2016).



Figura 3. Espécime de *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) (Siluriformes: Loricariidae). Fonte: <https://fishbase.mnhn.fr/summary/50636>.

Fauna parasitária de *Proloricaria prolixa*

A fauna parasitária de *P. prolixa* já foi investigada em outras bacias. Franceschini (2016) inventariou os parasitos dessa espécie no rio Sapucaí-Mirim, município de São Joaquim da Barra, SP, um rio tributário do Rio Grande. Nesse trabalho foram encontradas metacercárias de *Austrodiplostomum* sp. (Digenea); *Procamallanus* (*Spirocamallanus*) sp., *Rhabdochona* sp., larvas L3 de *Contracaecum* sp., a fêmea vivípara de um nematoide não identificado (Nematoda) e sanguessugas não identificadas da família Glossiphoniidae (Hirudinea), *Demidospermus paranaensis* Ferrari-Hoeinghaus, Bellay, Takemoto & Pavanelli, 2010 e outras duas novas espécies de *Demidospermus* (Monopisthocotyla). Posteriormente, Franceschini *et al.* (2018) descreveram estas novas espécies como *Demidospermus spirophallus* Franceschini, Zago, Müller, Francisco, Takemoto & da Silva, 2017 e *Demidospermus prolixus* Franceschini, Zago, Müller, Francisco, Takemoto & da Silva, 2017, ambos coletados a partir de exemplares de *P. prolixa* do rio Sapucaí-mirim.

Pelegrini *et al.* (2018) relatou a biodiversidade e ecologia dos parasitos de *P. prolixa* da bacia do Tietê-Batalha, sendo identificados espécimes de *D. spirophallus* (Monopisthocotyla); *Clinostomum detruncatum* Braun, 1899 e metacercárias de *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928) (Digenea); *Rhabdochona kidderi*, Pearse, 1936, *Procamallanus (Spirocamallanus) inopinatus* Travassos, Artigas & Pereira, 1928, *Procamallanus (Spirocamallanus) rebecae* (Andrade-Salas, Pineda-López & García-Magaña, 1994) e *Cucullanus pinnai pinnai* Travassos, Artigas & Pereira, 1928 (Nematoda), além de exemplares não identificados de metacercárias da família Diplostomidae (Digenea); *Rhabdochona* sp. e *Contracaecum* sp. (Nematoda); sanguessugas do gênero *Oligobdella* (Hirudinea) e protozoários do gênero *Trypanosoma*.

Pelegrini *et al.* (2019) fez a caracterização morfológica e molecular da metacercária de uma espécie de diplostomídeo encontrada nas lentes dos olhos de diversas espécies de peixes siluriformes, incluindo *P. prolixa*. Essas metacercárias foram identificadas como Diplostomidae gen. sp. A caracterização molecular identificou dois haplótipos dentro desse táxon: Diplostomidae gen. sp. haplótipo 1 e Diplostomidae gen. sp. haplótipo 2, que formaram entre si um ramo de alto suporte, tendo como clado-irmão uma sequência de *Diplostomum ardeae* Dubois, 1969, uma espécie relatada no Canadá. A filogenia do trabalho indicava que as sequências de Diplostomidae gen. sp. eram uma nova espécie, congênera de *D. ardeae*, mas os autores optaram por não a identificar como *Diplostomum* sp., já que a filogenia também indicava o não pertencimento de *D. ardeae* ao gênero *Diplostomum*, o que já havia sido proposto por Locke *et al.* (2015).

2. OBJETIVOS

- Identificar os helmintos de *P. prolixa* no rio Pardo, estado de São Paulo, através de estudos taxonômicos baseados em análises morfológicas e moleculares.
- Determinar os descritores de prevalência, intensidade média de infecção/infestação e abundância de cada espécie de helminto parasito encontrada.
- Realizar análises filogenéticas dos parasitos com base em dados moleculares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta dos hospedeiros

A coleta dos hospedeiros foi realizada em um trecho lótico do rio Pardo, cercado por mata ciliar (**Figura 4 e 5**) e localizado entre os municípios de Ourinhos e Salto Grande (22°55'53.7"S 49°55'15.9"W). Foram usadas redes de espera para coletar 30 espécimes de *P. prolixa*, medindo entre 24 e 38 cm ($33,03 \pm 0,74$ cm) de comprimento padrão e pesando entre 69,60 e 445 g ($268,40 \pm 19,47$ g). Alguns espécimes foram transportados em tanques com aeração para o laboratório, onde foram posteriormente necropsiados. Outros indivíduos foram acondicionados em gelo para o transporte até o laboratório, onde foram armazenados em freezer a -20°C. As coletas foram realizadas de acordo com a autorização SISBIO 60640-1 e da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências, Unesp, *Campus* de Botucatu (CEUA 1093).

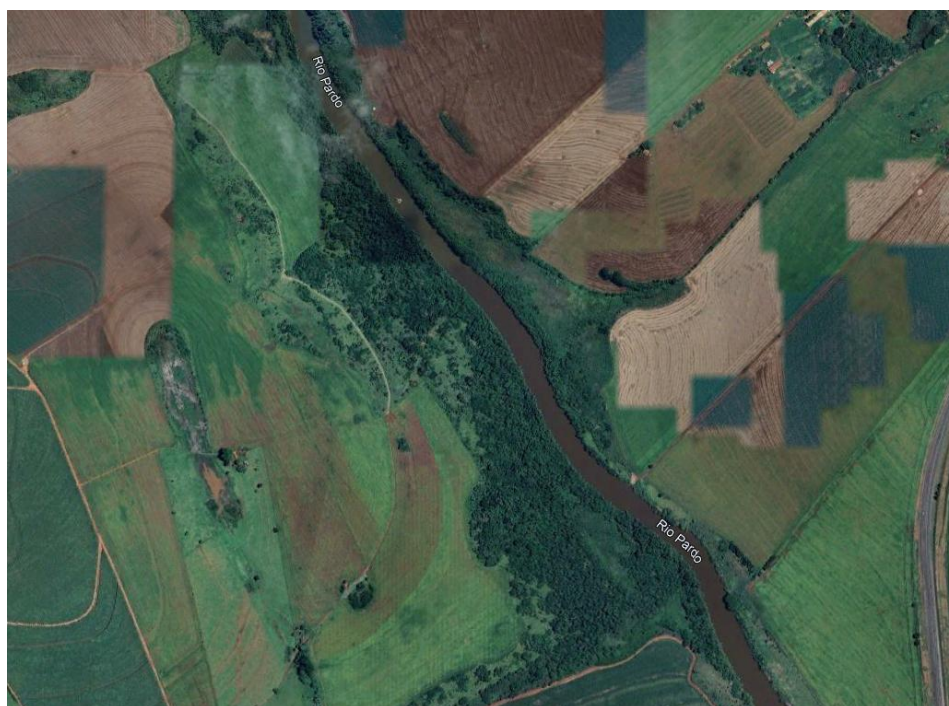


Figura 4. Vista aérea do local de coleta no rio Pardo, localizado entre os municípios de Ourinhos e Salto Grande (Fonte: GoogleEarth).



Figura 5. Fotografia do local de coleta no rio Pardo, localizado entre os municípios de Ourinhos e Salto Grande.

3.2. Identificação morfológica dos hospedeiros

Todos os 30 peixes coletados possuíam uma faixa transversal escura na região pré-orbital seguida por uma faixa transversal clara na região orbital e pele marcada por poucos pontos de margem fracamente delimitada (**Figura 3**). Adicionalmente, 24 dos 30 peixes coletados possuíam apenas três placas ósseas pré-dorsais adjacentes à placa óssea parieto-supraoccipital, enquanto cinco espécimes possuíam uma placa supranumerária (**Figura 6**) e um único espécime apresentava um par de placas supranumerárias (uma de cada lado). Quinze dos trinta espécimes também tiveram suas placas parieto-supraoccipitais avaliadas quanto à quantidade de estruturas chamadas de odontódes: seis possuíam uma única linha de odontódes, três possuíam duas linhas que se convergiam em uma, e seis possuíam duas linhas separadas de odontódes. A análise destes caracteres morfológicos confirmou que se tratava exclusivamente de membros da espécie *P. prolixa*.

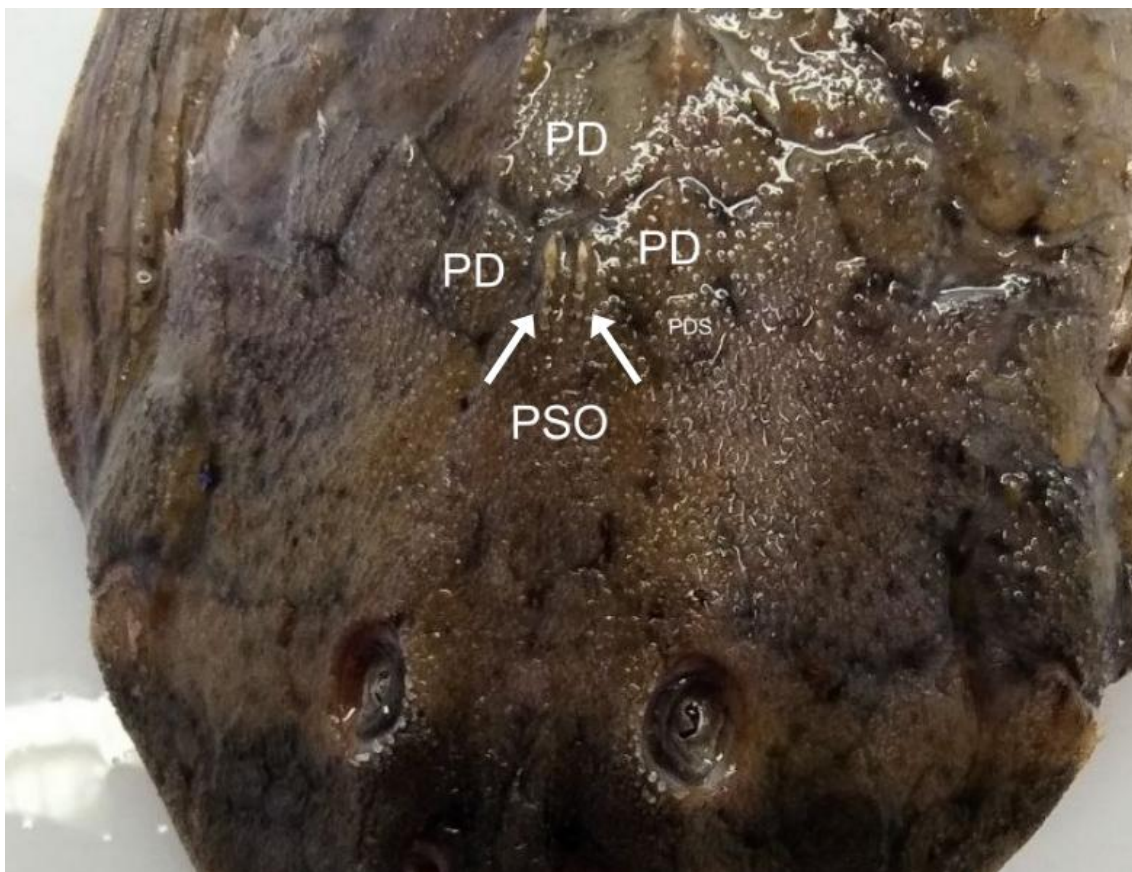


Figura 6. Espécime de *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) coletado em Salto Grande, SP. **PSO:** Placa óssea parieto-supraoccipital. **PD:** Placas ósseas pré-dorsais adjacentes à parieto-supraoccipital. **PDS:** Placa óssea pré-dorsal suprenumerária. **Setas** indicando as duas fileiras de odontódes na PSO.

3.3. Necropsia, coleta dos parasitos e identificação

Os parasitos coletados foram processados para a análise morfológica de acordo com técnicas parasitológicas propostas por Eiras *et al.* (2006). Exemplos de cada helminto também foram preservados em álcool etílico absoluto (Sigma®) para realização de estudos moleculares.

Para examinar a superfície da pele dos peixes foi feito um lavado com solução fisiológico aquecido, coletando o líquido do lavado. O conteúdo da superfície foi examinado em estereomicroscópio para a busca de helmintos. Utilizando-se uma micropipeta, o mesmo procedimento de lavagem e coleta foi realizado com as narinas, boca e ânus. Em seguida, as brânquias dos hospedeiros foram retiradas, separando os arcos branquiais em placas de Petri com água. Após a retirada das brânquias, foram coletados lavados da cavidade oral. Os olhos do hospedeiro foram retirados, abertos e

observados em estereomicroscópio, assim como as vísceras. Após a retirada das vísceras, foram coletados lavados da cavidade visceral.

Exemplares dos monopistocotilos encontrados foram montados em lâminas empregando os meios de Hoyer ou Gray e Wess, visando o estudo das estruturas esclerotizadas destes parasitos (Kritsky *et al.*, 1986; Eiras *et al.*, 2006). Trematódeos encontrados foram fixados em formol 4% aquecido e preservados em álcool etílico 70%. Para a análise morfológica, os exemplares foram corados com carmin clorídrico, submetidos a desidratação em série alcoólica crescente e diafanizados em eugenol. Nematóides foram preservados em álcool etílico 70% e submetidos à diafanização por lactofenol de Amann para a análise das estruturas de valor sistemático.

Análises morfológicas e morfométricas dos parasitos foram realizadas utilizando microscópio óptico equipado com sistema computadorizado de análise de imagem com Contraste de Interferência Diferencial 14 (Differential Interference Contrast - DIC) - LAS V3 (Leica Application Suite) e contraste de fase.

A prevalência, abundância e intensidade média de infestação das espécies de helmintos encontradas nos exemplares de *P. prolixa* foram calculadas de acordo com Bush *et al.* (1997).

3.4. Extração de DNA genômico e PCR

O DNA foi extraído dos espécimes usando o kit Qiagen Dneasy® Blood and Tissue, de acordo com o protocolo do fabricante. Técnicas de PCRs convencionais foram feitas com primers específicos para DNA nuclear e mitocondrial com os primers específicos para os grupos de helmintos que foram encontrados. Para isso foi usado o kit Pure Taq Ready-to-Go PCR beads (Amersham Biosciences). Com o resultado do PCR convencional, foi feito um gel de agarose para quantificação das bandas e em seguida os produtos de PCR foram purificados através do Kit QIAquick PCR purification (Qiagen).

3.5. Sequenciamento e reconstrução filogenética

O sequenciamento foi enviado ao laboratório de Laboratório de Diagnóstico Molecular, Unesp Botucatu. As sequências foram editadas no software Sequencher® v.5.2 (Gene 15 Codes) e alinhadas usando os parâmetros implementados no Guidance (Sela *et al.*, 2015). Análises filogenéticas foram rodadas nos critérios de Máxima Verossimilhança (Maximum likelihood – ML) e Inferência Bayesiana (Bayesian

inference – BI) aplicando os modelos evolutivos que foram selecionados usando jModelTest 2.1.1 (Guindon e Gascuel, 2003; Darriba *et al.*, 2012). Análises de ML foram realizadas no programa RAxML v. 8 (Stamatakis, 2014) e BI foram realizadas utilizando MrBayes v. 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012). As análises MrBayes e RAxML foram realizadas no recurso computacional CIPRES (Miller *et al.*, 2010). O programa Mega 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) foi usado para as análises de distâncias genéticas. As análises concatenadas foram realizadas no programa Geneious version 8 (Kearse *et al.*, 2012). As árvores filogenéticas foram editadas no FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

4. RESULTADOS

4.1. Helmintos coletados

Vinte e seis dos trinta espécimes de *P. prolixa* analisados estavam parasitados por pelo menos uma espécie de helminto. Foram coletados 488 helmintos parasitos pertencentes a dez táxons, sendo três espécies de monopistocotilos, duas espécies de digenéticos na forma adulta, quatro metacercárias de digenéticos e uma espécie de nematoide (**Tabela 1**).

Tabela 1. Helmintos encontrados parasitando *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) (n = 30) no rio Pardo e seus parâmetros ecológicos de parasitismo. Bo = Boca; Br = Brânquias; CO = Lavado da cavidade oral; O = Olhos; I = Intestino; CV = Lavado da cavidade visceral; EP = Erro padrão da média.

Espécies	Prevalência (%)	Intensidade média ± EP	Abundância média ± EP	Sítio de infecção
Monopistocotyla				
<i>Demidospermus spirophallus</i> Franceschini, Zago, Müller, Francisco, Takemoto & Silva, 2017	80	15,33 ± 3,09	12,27 ± 2,71	Br
<i>Demidospermus prolixus</i> Franceschini, Zago, Müller, Francisco, Takemoto & Silva, 2017	26,67	1,87 ± 0,48	0,50 ± 0,20	Br
<i>Demidospermus</i> sp. Suriano, 1983	3,33	1	0,03 ± 0,03	Br
Digenea				
<i>Creptotrema creptotrema</i> Travassos, Artigas & Pereira, 1928	3,33	8	0,27 ± 0,27	I
Halipeginae gen. sp. Poche, 1926	3,33	1	0,03 ± 0,03	CO
<i>Austrodiplostomum compactum</i> (Lutz, 1928) Dubois, 1970 (metacercárias)	40	6,92 ± 3,39	2,77 ± 1,46	O
Diplostomidae gen. sp. (metacercárias) Szidat & Nani, 1951	6,67	3,00 ± 2,00	0,20 ± 0,17	Bo, Br, CO, CV
<i>Diplostomum</i> sp. (Lutz, 1928) Dubois, 1970 (metacercárias)	3,33	2	0,07 ± 0,07	Br, CO
<i>Tylodelphis</i> sp. Diesing, 1850 (metacercárias)	10	2,33 ± 0,88	0,23 ± 0,15	CO, CV
Nematoda				
<i>Rhabdochona acuminata</i> Moli, 1860	20	7,17 ± 2,59	1,43 ± 0,72	I
Total	86,67	18,77 ± 3,32	16,27 ± 3,1	

4.2. Descrição morfológica dos helmintos

Filo Platyhelminthes

Classe Monopisthocotyla

Ordem Dactylogyridea

Família Dactylogyridae

***Demidospermus spirophallus* Franceschini, Zago, Müller, Francisco, Takemoto & Silva, 2017 (Figura 7).**

Descrição: n = 6; corpo alongado e fusiforme, medindo 473,2 μm (382,9 - 582,6 μm ; n = 5) de comprimento total; corpo dividido em região cefálica, tronco, pedúnculo e háptor; parte mais larga do corpo = 76,24 μm (59,9 - 92,0 μm ; n = 6) localizada entre o complexo copulatório masculino e a vagina; três pares de órgãos cefálicos; faringe pouco evidente, com 29,3 μm (28,7 - 29,8 μm ; n = 2) de comprimento e 25,2 (20,4 - 30,0 μm ; n = 2) de largura; ausência de manchas oclares; órgão copulatório masculino em forma de espiral, formado por cerca de 2,75 aros em sentido anti-horário, com 219,5 μm (204,0 - 226,7 μm ; n = 4) de comprimento; gônadas não observadas; ovo de formato elíptico medindo 92,0 μm de comprimento e 45,0 μm de largura e dotado de um filamento posterior de 48,0 μm (n = 1); vagina sinistral fracamente esclerotizada, tubular e curvada; pedúnculo curto (similar em comprimento ao háptor); háptor com 50,9 μm (41,4-60,9 μm ; n = 6) de comprimento e 66,5 μm (52,5 - 92,0 μm ; n = 6) de largura; um par de barras e dois pares de âncoras; ambas as barras em forma de V, sendo a barra dorsal mais ampla e aberta e a ventral mais fechada e com extremidades que se curvam em direção às laterais; ambas as barras dotadas de um estreitamento medial na base que permite a articulação entre suas duas metades e torna a angulação entre essas duas metades variável; os dois pares de âncoras são muito similares em tamanho e formato, possuindo base e ponta retos; ganchos medindo 13,5 μm (13,1 – 13,8 μm).

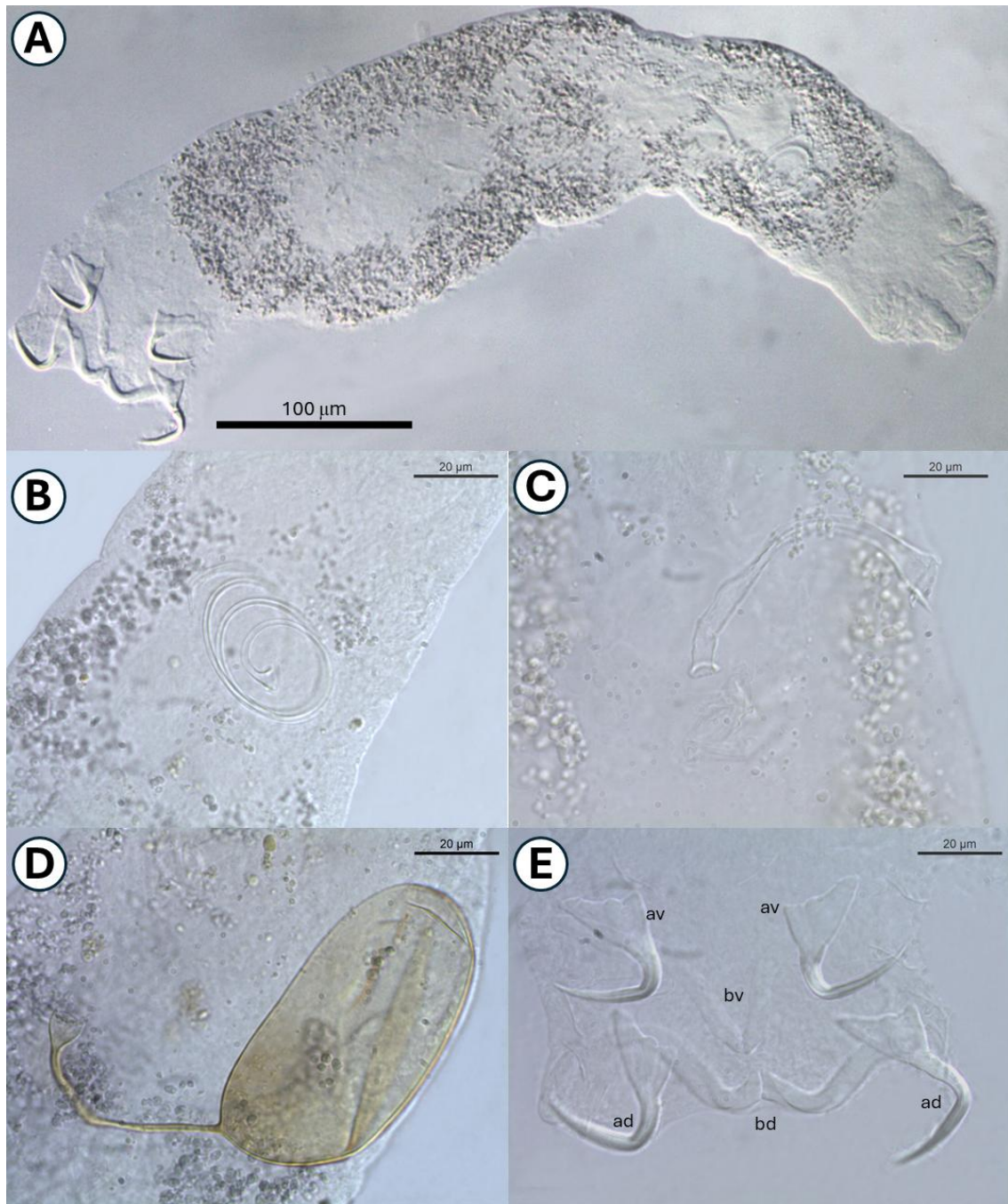


Figura 7. *Demidospermus spirophallus* Franceschini, Zago, Müller, Francisco, Takemoto & Silva, 2017 coletado em brânquias de *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) procedente do rio Pardo, Salto Grande, São Paulo. **(A)** Corpo; **(B)** Complexo copulatório masculino; **(C)** Vagina esclerotizada; **(D)** Ovo; e **(E)** Háptor - av: âncoras ventrais, bv: barra ventral, ad: âncoras dorsais, e bd: barra dorsal.

***Demidospermus prolixus* Franceschini, Zago, Müller, Francisco, Takemoto & Silva, 2017 (Figura 8).**

Descrição: n = 2; Corpo alongado e fusiforme, medindo 359,4 (326,2 - 392,6) de comprimento total; corpo dividido em região cefálica, tronco, pedúnculo e háptor; a parte mais larga do corpo é o háptor ou o órgão copulatório masculino, medindo 91,3 (90,6 - 92) µm de largura; ausência de manchas ocelares; faringe medindo 29,3 (28,7 - 29,8) de comprimento por 25,19 (20,37 - 30,01) de largura; órgão copulatório masculino em forma de espiral irregular, formado por cerca de 1,5 aro em sentido anti-horário, com 221,9 µm de comprimento; gônadas não observadas; ovo não observado; vagina não esclerotizada, um par de barras, dois pares de âncoras e ganchos (não observados); ambas as barras articuladas, em forma de V, sendo a dorsal dotada um estreitamento medial e uma evidente mudança de angulação em cada uma das metades; a barra ventral, mais aberta e dotada de mudança de angulação menos evidente.

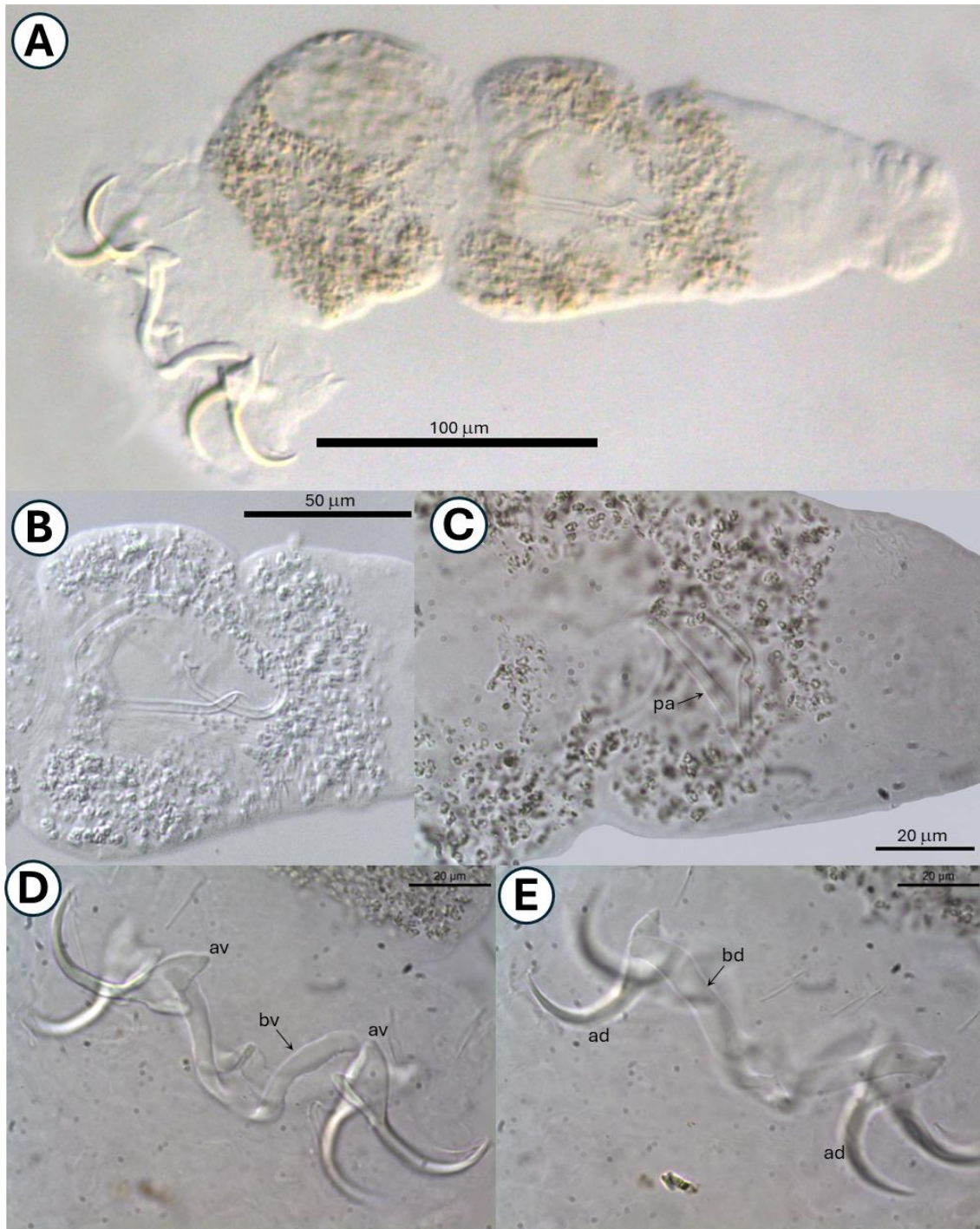


Figura 8. *Demidospermus prolixus* Franceschini, Zago, Müller, Francisco, Takemoto & Silva, 2017 coletado em brânquias de *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) procedente do rio Pardo, Salto Grande, São Paulo. (A) Corpo; (B e C) Complexo copulatório masculino - pa: peça acessória (D e E) Háptor - av: âncoras ventrais, bv: barra ventral, ad: âncoras dorsais, e bd: barra dorsal.

***Demidospermus* sp. (Figura 9).**

Descrição: n = 1; corpo alongado e fusiforme, não sendo possível medir seu comprimento total; corpo dividido em região cefálica, tronco, pedúnculo e háptor; a parte mais larga do corpo é o háptor, medindo 153,7 μm de largura por 95,7 de comprimento; faringe não observada; ausência de manchas ocelares; órgão copulatório masculino em forma de espiral, formado por cerca de 2,5 aros em sentido anti-horário, com 251,1 μm de comprimento e um órgão acessório 22,3 μm de comprimento; gônadas não observadas; ovo não observado; vagina sinistral fracamente esclerotizada, tubular e curvada, medindo 61,9 μm ; pedúnculo curto (similar em comprimento ao háptor); um par de barras, dois pares de âncoras e ganchos não observados; ambas as barras em forma de V, sendo a barra ventral mais ampla e aberta, com uma notável mudança de angulação e evidentes bifurcações nas extremidades; ao traçar uma linha reta entre as extremidades desta barra, obtém-se a distância de 47,2 μm , e a distância entre essa linha e o trecho medial da barra mede 20,0 μm ; o comprimento da curva formada pela barra é de 67,4 μm e o trecho mais espesso da barra mede 5,7 μm ; já a barra dorsal era mais espessa, fechada e com extremidades de aparência digitiforme; ao traçar uma linha reta entre as extremidades desta barra, obtém-se a distância de 38,88 μm , e a distância entre essa linha e o trecho medial da barra mede 19,3 μm ; o comprimento da curva formada pela barra é de 54,7 μm e o trecho mais espesso da barra mede 6,6 μm ; ambas as barras são dotadas de um estreitamento medial na base que permite a articulação entre suas duas metades e torna a angulação entre essas duas metades variável; os dois pares de âncoras são muito similares em tamanho e formato, possuindo base e ponta retos, longas raízes profundas em ambos os pares, medindo 9,5 μm e 9,9 μm no par dorsal e 13,1 μm e 9,4 μm no par ventral; raízes superficiais medindo 21,8 μm e 16,2 μm no par dorsal e 22,9 e 19,9 μm no par ventral; ganchos não observados.



Figura 9. Espécime de *Demidospermus* sp. coletado em brânquias de *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) procedente do rio Pardo, Salto Grande, São Paulo. **(A)** mco: complexo copulatório masculino v: vagina **(B)** háptor - av: âncoras ventrais bv: barra ventral com extremidades bifurcadas (seta contínua), ad: âncoras dorsais, e bd: barra dorsal evidenciando a extremidade digitiforme (seta pontilhada).

Classe Trematoda

Subclasse Digenea

Ordem Plagiorchiida

Família Allocreadiidae

***Creptotrema creptotrema* Travassos, Artigas & Pereira, 1928 (Figura 10).**

Descrição: n = 8; Corpo arredondado, medindo 663,5 μm (594,6 – 771,3 μm ; n = 5) de comprimento total e 447,8 μm (398,0 – 505,3 μm ; n = 8) de largura máxima no meio do corpo; ventosa oral subterminal, medindo 154,0 μm (107,3 – 200,0 μm ; n = 5) de comprimento por 143,1 μm (128,7 – 172,7 μm ; n = 5) de largura e dotada de aba em forma de ferradura na porção anterior; acetábulo maior que a ventosa oral, medindo 206,5 μm (145,5 – 273,2 μm ; n = 6) de comprimento por 214,3 μm (194,1 – 236,6 μm ; n = 6) de largura; faringe muscular medindo 47,0 μm (20,4 – 61,0 μm ; n = 3) de comprimento por 50,5 μm (20,2 – 67,8 μm ; n = 3) de largura; esôfago curto com 30,2 μm (28,8 – 31,6 μm ; n = 2) de comprimento e 18,6 μm (18,4 – 18,7 μm ; n = 2) de largura; bifurcação intestinal adjacente à margem anterior do acetábulo; cecos intestinais se estendem até a extremidade posterior do corpo, podendo ultrapassar os testículos; bolsa do cirro alongada, medindo 212,4 μm (208,8 – 215,9 μm ; n = 2) de comprimento por 38,3 μm (35,5 – 41,1 μm ; n = 2) de largura; glândula de Mehlis de formato triangular e adjacente à margem dextral do ovário; ovário póstero-sinistral ao acetábulo e anterior aos testículos, medindo 99,3 μm (75,7 – 113,0 μm ; n = 6) de comprimento e 78,4 μm (60,7 – 105,2 μm ; n = 6) de largura; testículos ovais, simétricos ou oblíquos, localizados no terço posterior do corpo, sendo o direito com 101,6 μm (71,6 – 148,4 μm ; n = 6) de comprimento por 72,6 μm (39,9 – 101,1 μm ; n = 6) de largura, e o esquerdo com 115,4 μm (76,4 – 183,4 μm ; n = 6) de comprimento por 84,6 μm (49,3 – 113,0 μm ; n = 6) de largura; ovos elípticos, poucos (8,3 em média; variando entre seis e dez nos sete espécimes avaliados) e grandes, medindo 69,5 μm (41,8 – 82,1 μm) de comprimento por 47,8 μm (40,9 – 68,6 μm) de largura. Vitelária composta por grandes folículos dispostos nas regiões extracecal, cecal e intercecal, desde a ventosa oral até a região posterior. Poro excretor terminal em forma de I, se estendendo até os testículos.

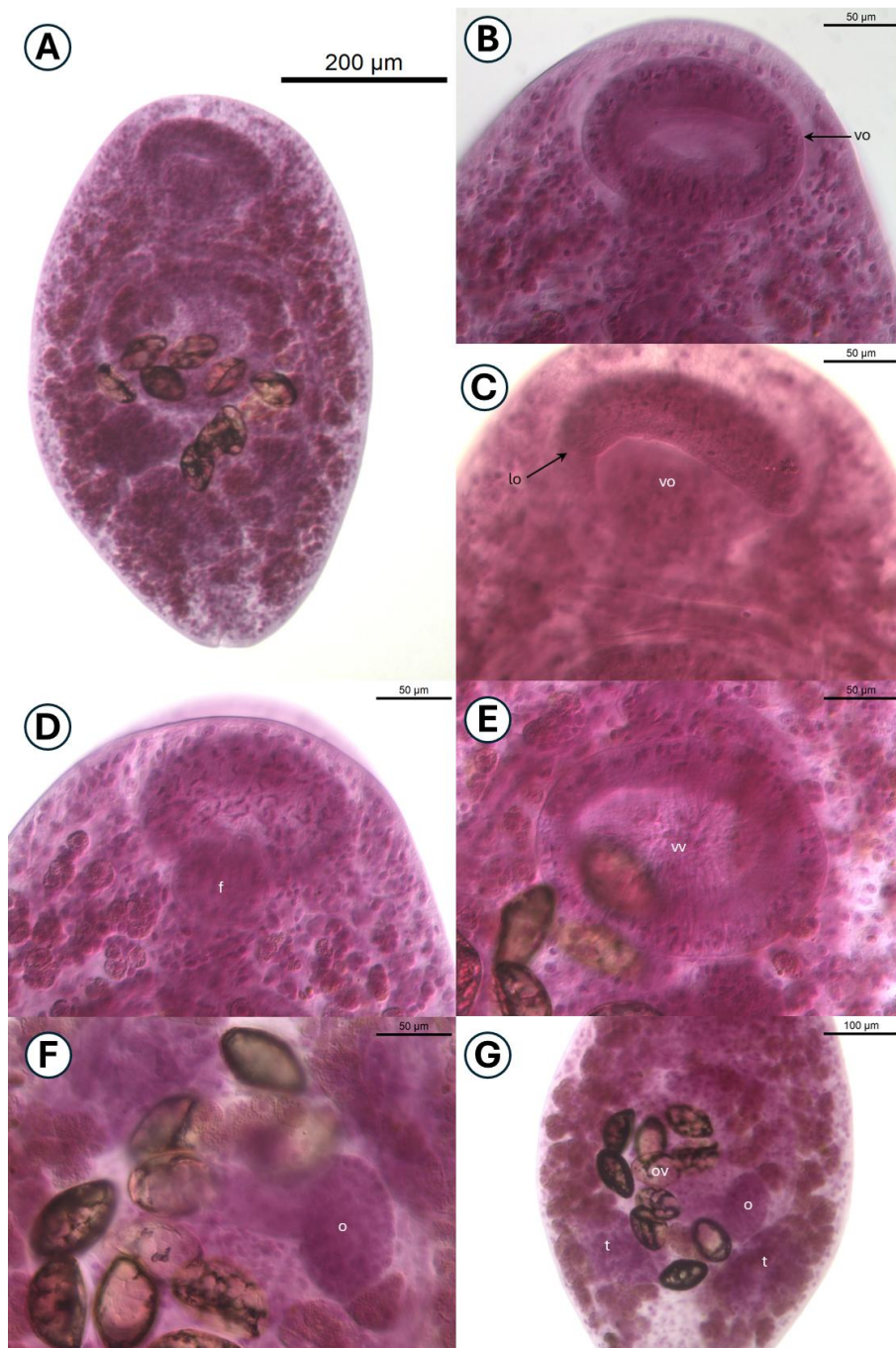


Figura 10. *Creptotrema creptotrema* Travassos, Artigas & Pereira, 1928 coletado em intestino de *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) procedente do rio Pardo, Salto Grande, São Paulo. (A) Corpo; (B) Ventosa oral (vo); (C) Lóbulo da ventosa oral (lo); (D) Faringe (f); (E) Ventosa ventral (vv); (F) ovário (o) e ovos; e (G) parte mediana do corpo – ovário (o), testículo (t) e ovos (ov). (A–C) Vista dorsal e (D–G) Vista ventral.

Classe Trematoda
Subclasse Digenea
Ordem Plagiorchiida
Família Derogenidae
Subfamília Halipeginae

Halipeginae gen. sp. Travassos, Artigas & Pereira, 1928 (Figura 11).

Descrição: n = 1; medindo 1.384 μm de comprimento total e 545,5 μm de largura máxima; ventosa oral medindo 170,9 μm de comprimento por 183,8 μm de largura; faringe muscular medindo 70,8 μm de comprimento por 59,9 μm de largura; esôfago alongado medindo 368,9 μm de comprimento por 414,9 μm de largura; acetábulo (ventosa ventral) grande, medindo 409,7 μm de comprimento por 367,2 μm de largura; vitelárias medindo 128,4 $\mu\text{m} \times 62,0 \mu\text{m}$ e 127,3 $\mu\text{m} \times 46,6 \mu\text{m}$; grande quantidade de ovos de formato elíptico, com as seguintes medidas: (n=10) 48,6 μm (45,1 μm – 50,8 μm) de comprimento e 24,9 μm (21,6 μm – 28,3 μm) de largura.

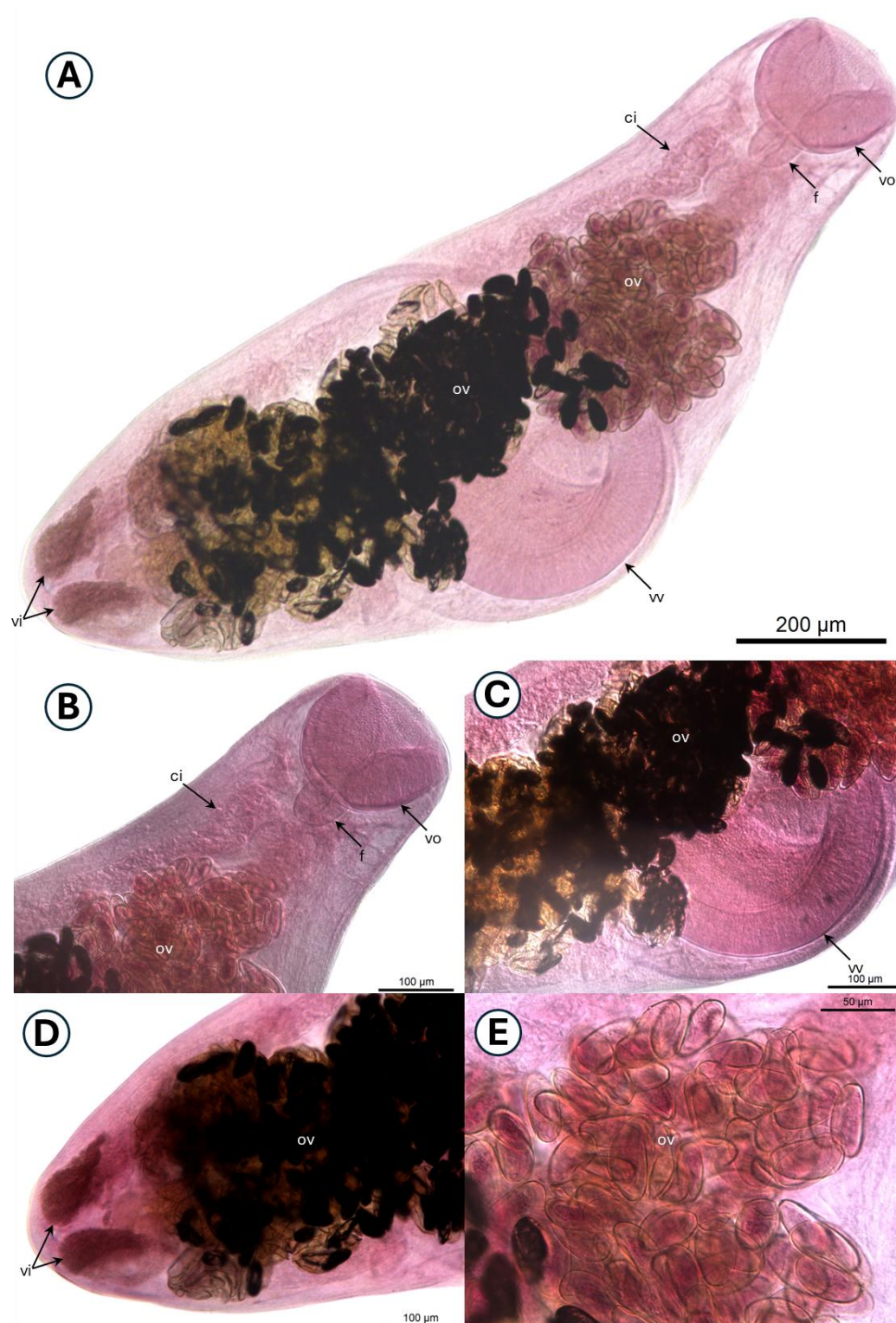


Figura 11. *Halipeginae* gen. sp. coletado em intestino de *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) procedente do rio Pardo, Salto Grande, São Paulo. **(A)** Corpo; **(B)** Porção anterior destacando a ventosa oral (vo), faringe (f) e ceco intestinal (ci); **(C)** Porção média do corpo mostrando a ventosa ventral (vv); **(D)** Porção posterior destacando as vitelárias (vi); **(E)** Região entre a faringe e acetábulo, mostrando os ovos (ov).

Classe Trematoda

Subclasse Digenea

Ordem Plagiorchiida

Família Diplostomidae

Metacercária de *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928) (Figura 12).

Descrição: n = 6; Corpo com formato espatulado e bissegmentado, medindo 1.023,7 µm (618,7 – 1.368,6 µm; n = 4) de comprimento total e 482,4 µm (233,3 - 672,9 µm; n = 6) de largura máxima, formado por um segmento anterior onde se encontram a maioria das estruturas do corpo, medindo 1.024,9 µm (564,6 – 1379,6 µm; n = 6) de comprimento e 482,4 µm (233,3 - 672,9 µm; n = 6) de largura, dotado de uma concavidade ventral; e um pequeno segmento posterior no formato de cone arredondado, medindo 141,7 µm (53,2 - 227,0 µm; n = 4) de comprimento e 87,0 µm (42,6 - 153,5 µm; n = 4) de largura; ventosa oral pequena e subterminal, medindo 51,4 µm (16,4 – 93,0 µm; n = 5) de comprimento e 59,2 µm (34,6 - 92,4 µm; n = 5) de largura; uma faringe oval e pouco evidente de 58,8 µm (40,4 - 68,6 µm; n = 3) de comprimento por 45,3 µm (13,7 - 70,0 µm; n = 3) de largura, duas pseudoventosas laterais pouco maiores que a ventosa oral, medindo 81,4 µm (63,2 µm – 109,6 µm, n = 6) de comprimento e 56,6 µm (46,2 µm – 67,1 µm, n = 6) de largura; células glandulares na parte anterior do corpo, iniciando após a bifurcação cecal e estendendo-se até quase o órgão tribocítico; dois cecos intestinais de fundo cego que alcançam o limite entre o segmento anterior e o posterior; grande e evidente órgão tribocítico mede 209,3 µm (91,5 - 291,6 µm; n = 4) de comprimento por 106,0 µm (40,7 - 156,7 µm; n = 4) de largura; entre o órgão tribocítico e o segmento posterior, estão localizados dois primórdios genitais.

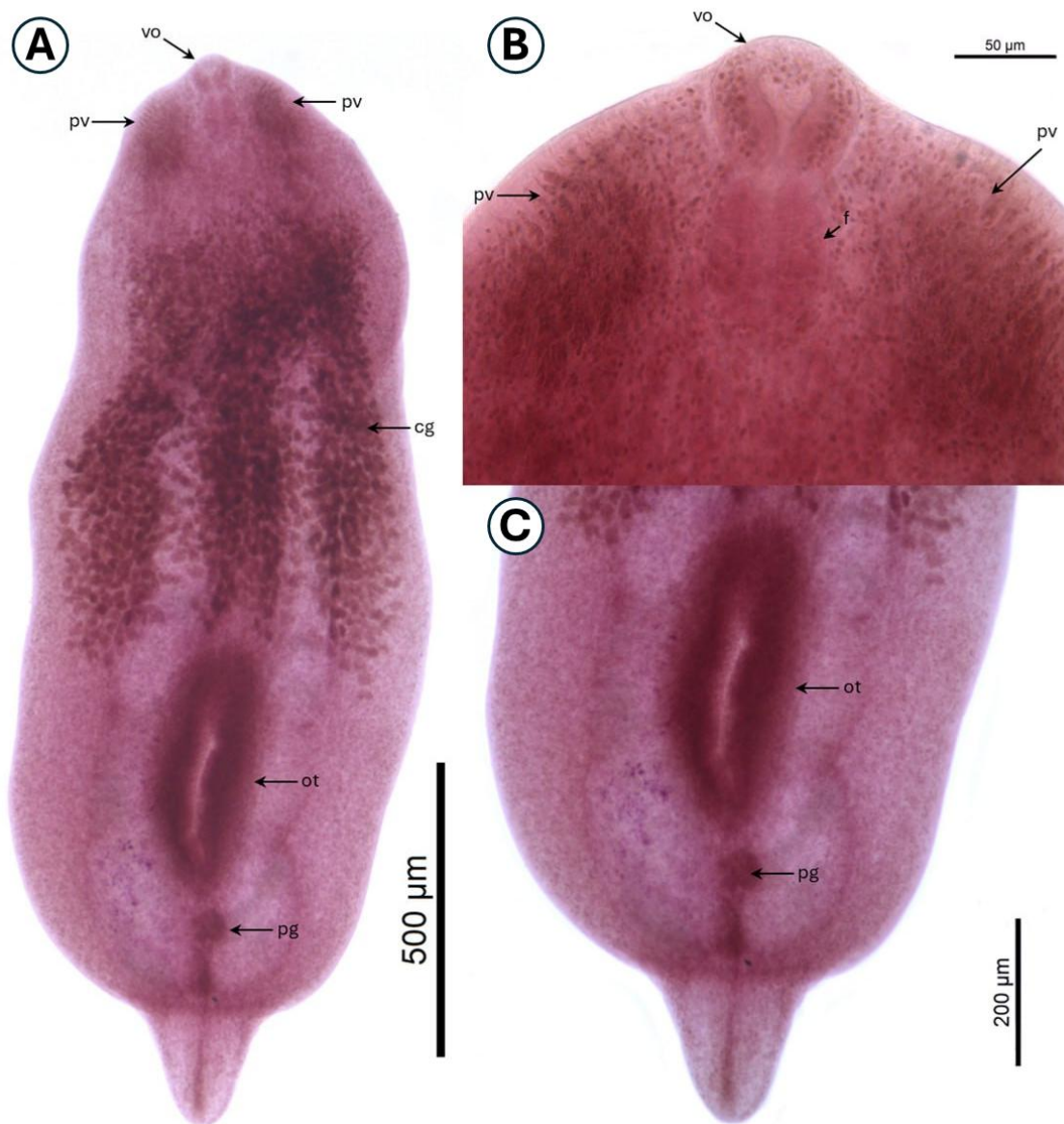


Figura 12. Metacercária de *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928) coletada no olho de *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) procedente do rio Pardo, Salto Grande, São Paulo. **(A)** corpo; **(B)** região anterior destacando a ventosa oral (vo), pseudoventosas (pv) e faringe (f); e **(C)** região posterior mostrando as células glandulares (cg), órgão tribocítico (ot) e primórdio genital (pg).

Metacercária de Diplostomidae gen. sp. (Lutz, 1928) (Figura 13).

Descrição: n = 1; Corpo de formato oval, medindo 1.022,7 μm de comprimento total; largura máxima de 693,2 μm , no trecho médio do corpo; ventosa oral protuberante, de formato assimétrico entre as margens anterior e posterior, margem posterior se estendendo em uma depressão de formato triangular; pseudoventosas posteriores e laterais à ventosa oral, de largura (95,3–96,2 μm) maior que o comprimento (69,5– 83,0 μm); células glandulares ocupando mais da metade corpo, iniciando logo após a ventosa oral e estendendo-se até quase o órgão tribocítico; cecos intestinais se estendendo até a margem posterior do órgão tribocítico; desprovido de acetábulo; órgão tribocítico medindo 210,4 μm de comprimento por 133,9 μm ; posteriores ao órgão tribocítico, encontram-se dois primórdios genitais posicionados lateralmente entre si.

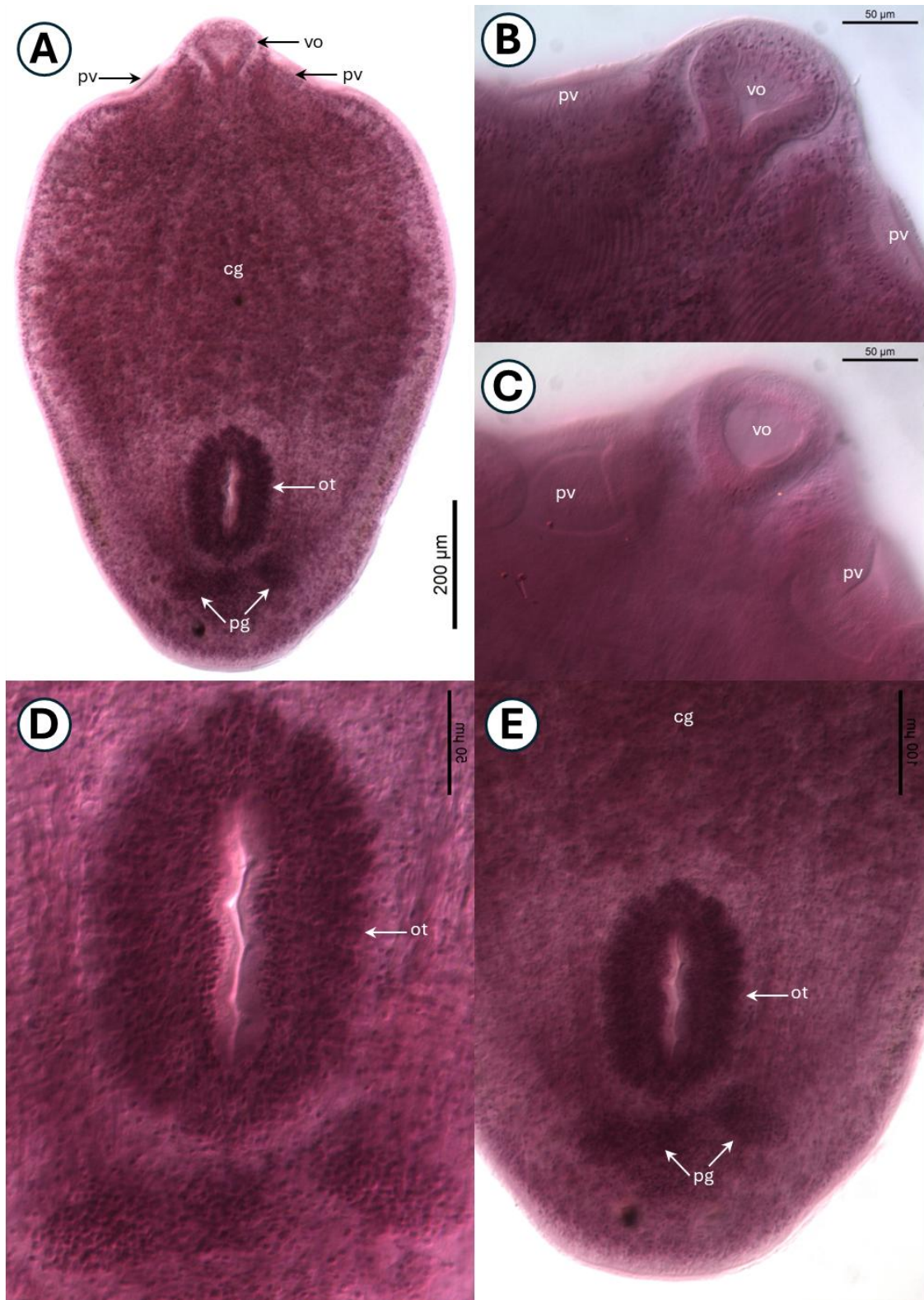


Figura 13. Diplostomidae gen. sp. retirado da cavidade visceral de *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) procedente do rio Pardo, Salto Grande, São Paulo.. **vo:** ventosa oral **pv:** pseudoventosas **cg:** células glandulares **ot:** órgão tribocítico **pg:** primórdio genital

Metacercária de *Diplostomum* sp. von Nordmann, 1832 (Figura 14).

Descrição: n = 1; Corpo com formato espatulado e bissegmentado, medindo 1.368,6 µm de comprimento total e 672,9 µm de largura máxima, ao nível do acetábulo, corpo dividido em segmento anterior, onde se encontram a maioria das estruturas do corpo, medindo 1.137,4 µm de comprimento e 672,9 µm de largura, e um pequeno segmento posterior de formato oval ou cônico, medindo 223,9 µm de comprimento e 88,9 µm de largura; ventosa oral terminal, no mesmo nível das pseudoventosas, medindo 71,4 µm de comprimento e 92,4 µm de largura; faringe de formato oval, medindo 67,4 µm de comprimento por 52,1 µm de largura, pseudoventosas medindo 192,3 µm e 113,9 µm de comprimento e 118,7 µm e 103,0 µm; células glandulares concentradas na região anterior, iniciando na região da bifurcação cecal e estendendo-se até a metade do corpo, terminando a 76,9 µm da ventosa ventral; cecos intestinais se estendendo até a margem posterior do órgão tribocítico; ventosa ventral medindo 119,5 µm de comprimento e 112,5 µm de largura; órgão tribocítico medindo 260,8 µm de comprimento por 154,3 µm de largura; entre o órgão tribocítico e o segmento posterior, estão localizados dois primórdios genitais laterais entre si, medindo 49,7 µm e 41,1 µm de comprimento e 36,9 µm e 49,7 µm de largura.

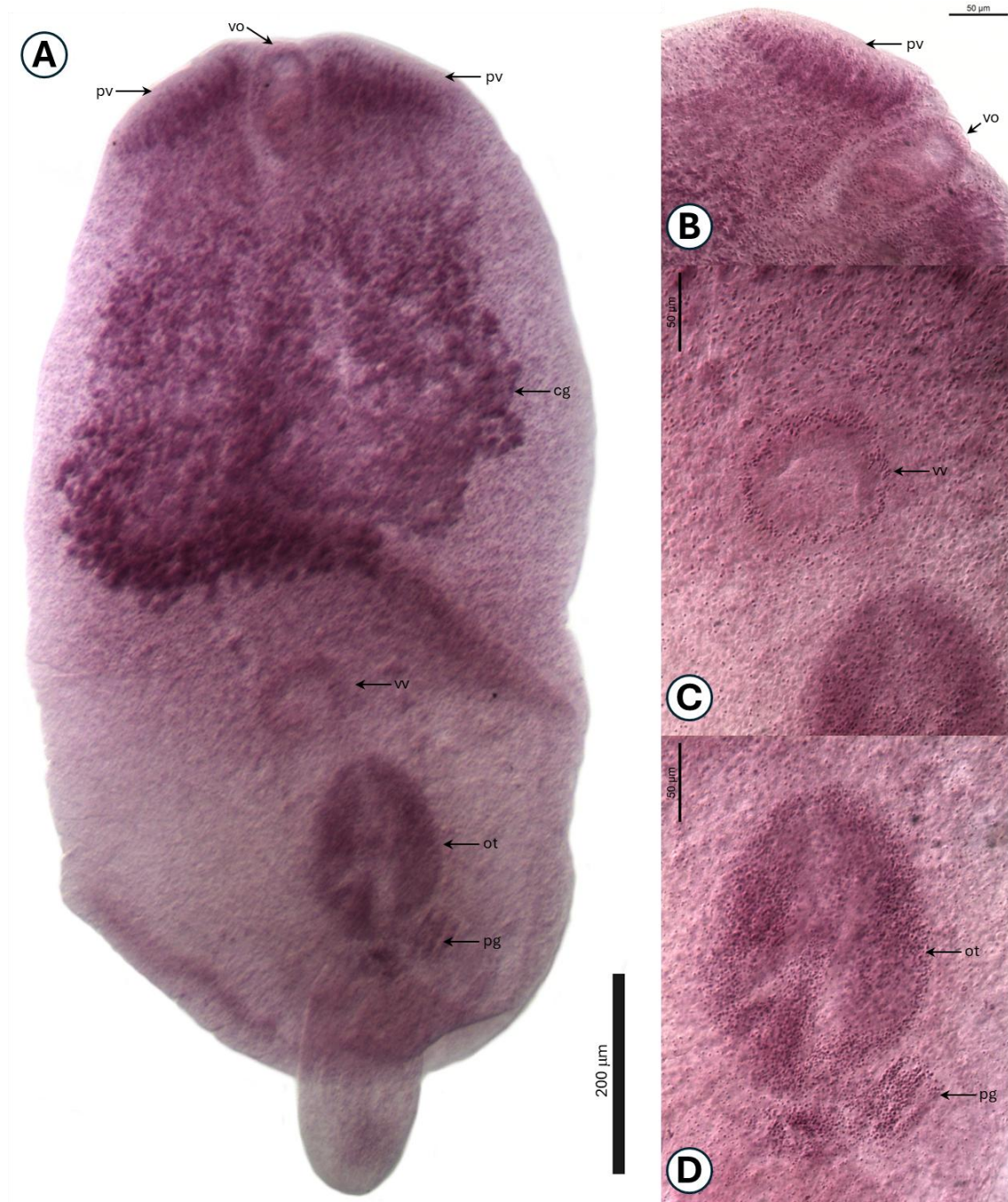


Figura 14. *Diplostomum* sp. retirado da cavidade visceral de *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) procedente do rio Pardo, Salto Grande, São Paulo. **vo:** ventosa oral **pv:** pseudoventosas **cg:** células glandulares **vv:** acetábulo (ventosa ventral) **ot:** órgão tribocítico **pg:** primórdio genital

Metacercária de *Tylodelphys* sp. Diesing, 1850 (Figura 15).

Descrição: n = 3; Corpo alongado, medindo 1.114,7 μm (1.022,0 – 1.210,4 μm ; n = 3) de comprimento total e 314,3 μm (273,6 – 352,8 μm ; n = 3) de largura máxima; ventosa oral medindo 54,9 μm (42,3 – 67,5 μm ; n = 2) de comprimento por 51,6 μm (48,0 – 55,1 μm ; n = 2) de largura; duas pseudoventosas laterais, direita medindo 25,4 μm (23,0 – 27,8 μm ; n = 2) de comprimento por 32,0 μm (27,2 – 36,8 μm ; n = 2) de largura, e a esquerda medindo 26,0 μm (23,8 – 28,2 μm ; n = 2) de comprimento por 32,8 μm (29,9 – 35,6 μm ; n = 2) de largura; acetábulo medindo 69,6 μm (56,2 – 92,0 μm ; n = 3) de comprimento por 61,6 μm (51,2–74,4 μm ; n = 3) de largura; órgão tribocítico proeminente, medindo 169,1 μm (162,4–177,3 μm ; n = 3) de comprimento por 95,2 μm (88,1–101,6 μm ; n = 3) de largura. O segmento posterior do corpo é cônico, curto e praticamente contínuo com o segmento anterior, exceto por um espécime, em que se observou uma maior distinção entre os segmentos, com segmento anterior medindo 957,3 μm de comprimento e região posterior medindo 71,9 μm de comprimento por 117,6 μm de largura.



Figura 15. Metacercária de *Tylodelphys* sp. Diesing, 1850 coletada da brânquia de *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) procedente do rio Pardo, Salto Grande, São Paulo. **(A)** corpo destacando a ventosa oral (vo), ventosa ventral (vv) e órgão tribocítico (ot); **(B)** Detalhe da ventosa oral (vo) e faringe (f); **(C)** detalhe da ventosa ventral (vv); e **(D)** Detalhe do órgão tribocítico (ot).

Filo Nematoda

Classe Chromadorea

Ordem Rhabditida

Família Rhabdochonidae

***Rhabdochona acuminata* (Molin, 1860) (Figuras 16-19).**

Descrição geral (adultos): Cutícula dotada de leve estriação transversal; abertura oral em forma de retângulo arredondado, com arestas laterais maiores e arestas dorsal e ventral menores; quatro estruturas orais internas similares a papilas; dois anfídios, ambos acompanhados de um adorno cuticular; quatro papilas cefálicas. Sistema digestório dividido em prostômio, vestibulo, esôfago muscular, esôfago glandular, intestino e cloaca/ânus; prostômio em forma de funil com 14 dentes basais de formato cônico (três dorsais, três ventrais e oito laterais: dois pares laterais próximos à margem dorsal e dois pares laterais próximos à margem ventral); deirídios simples de formato cônico arredondado, desprovidos de bifurcação ou qualquer tipo de ornamentação; caudas cônicas dotadas de fasmídios.

Machos: Corpo medindo 10,05 mm (8,08 – 11,72 mm) de comprimento e 115,25 µm (79,96-133,13 µm) de largura máxima; prostômio medindo 24,10 µm (20,46-26,79 µm); o comprimento do prostômio somado ao vestibulo é de 140,90 µm (111,22-178,47 µm); esôfago muscular medindo 384,15 µm (339,15-413,11 µm) de comprimento; esôfago glandular medindo 1.682,20 µm (1.101,28-2115,82 µm) de comprimento; anel nervoso a 206,70 µm (192,11-222,03 µm) da extremidade anterior; poro excretor a 286,396 µm da extremidade anterior; deirídios a 66,86 µm da extremidade anterior; nove pares de papilas pré-cloacais foram observadas no ventre dos vermes e um par adicional de papilas laterais pré-cloacais pode ser visto ao lado da terceira papila ventral a partir da cloaca; 9 pares de papilas pós-cloacais foram observadas no ventre dos vermes e um par adicional de papilas laterais pode ser visto entre a primeira e a segunda papilas ventrais a partir da cloaca; espículos desiguais em tamanho e formato; espículo direito medindo 98,90 µm (97,25 - 100,13 µm) de comprimento, espículo esquerdo medindo 529,31 µm (515,72 - 538,32 µm) de comprimento, composto por uma extremidade proximal em forma de cabeça de prego, uma haste que corresponde a cerca de metade do comprimento total do espículo e uma extremidade distal em forma de bota, sendo o “salto” a membrana ventral e a “ponta” o gancho dorsal; cauda de formato cônico medindo 409,02 µm (367,83 - 450,22 µm).

Fêmea: Corpo medindo 18,94 mm de comprimento e 240,47 μm de largura máxima; prostômio medindo 30,27 μm ; o comprimento do prostômio somado ao vestíbulo é de 130,71 μm ; esôfago muscular medindo 482,79 μm de comprimento; esôfago glandular medindo 2.168,32 μm de comprimento; anel nervoso a 256 μm da extremidade anterior; poro excretor a 318,076 μm da extremidade anterior; vulva pós-equatorial, a 1.613,77 μm de distância da extremidade posterior; abertura da vulva culminando posteriormente na vagina muscular, parte inicial do órgão ovejetor, cujo trecho final, a trompa, culmina no útero anfidelfo; ovos lisos, ovais e desprovidos de filamentos; ovos próximos ao ovejetor contendo larvas em desenvolvimento e medindo 25,13 μm (23,28 – 27,39 μm) de comprimento e 16,31 μm (14,56 – 18,20 μm) de largura; cauda de formato cônico medindo 421,40 μm .

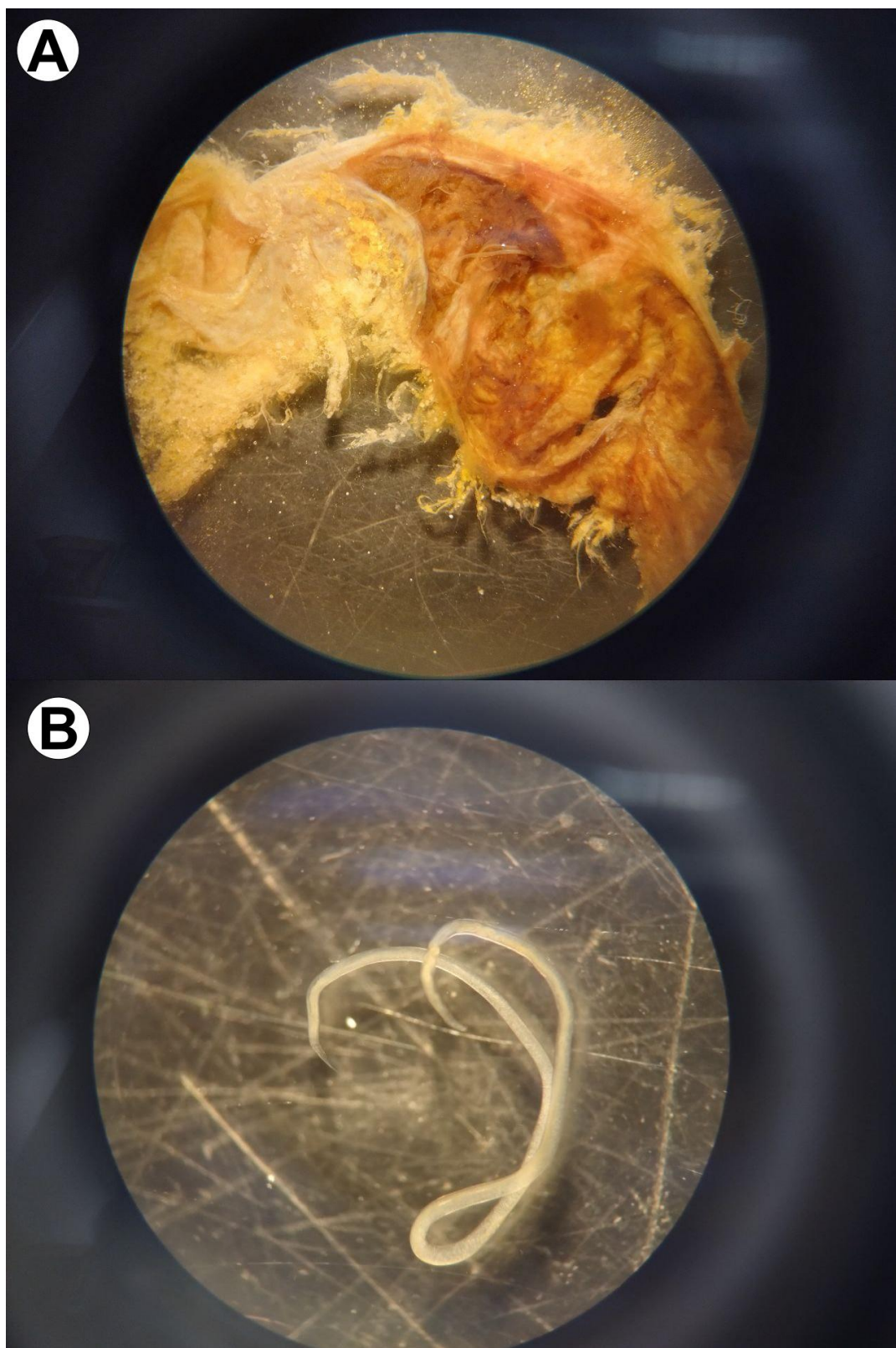


Figura 16. (A–B): espécime de *Rhabdochona acuminata* (Molin, 1860) retirado da luz do intestino de *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) procedente do rio Pardo, Salto Grande, São Paulo.

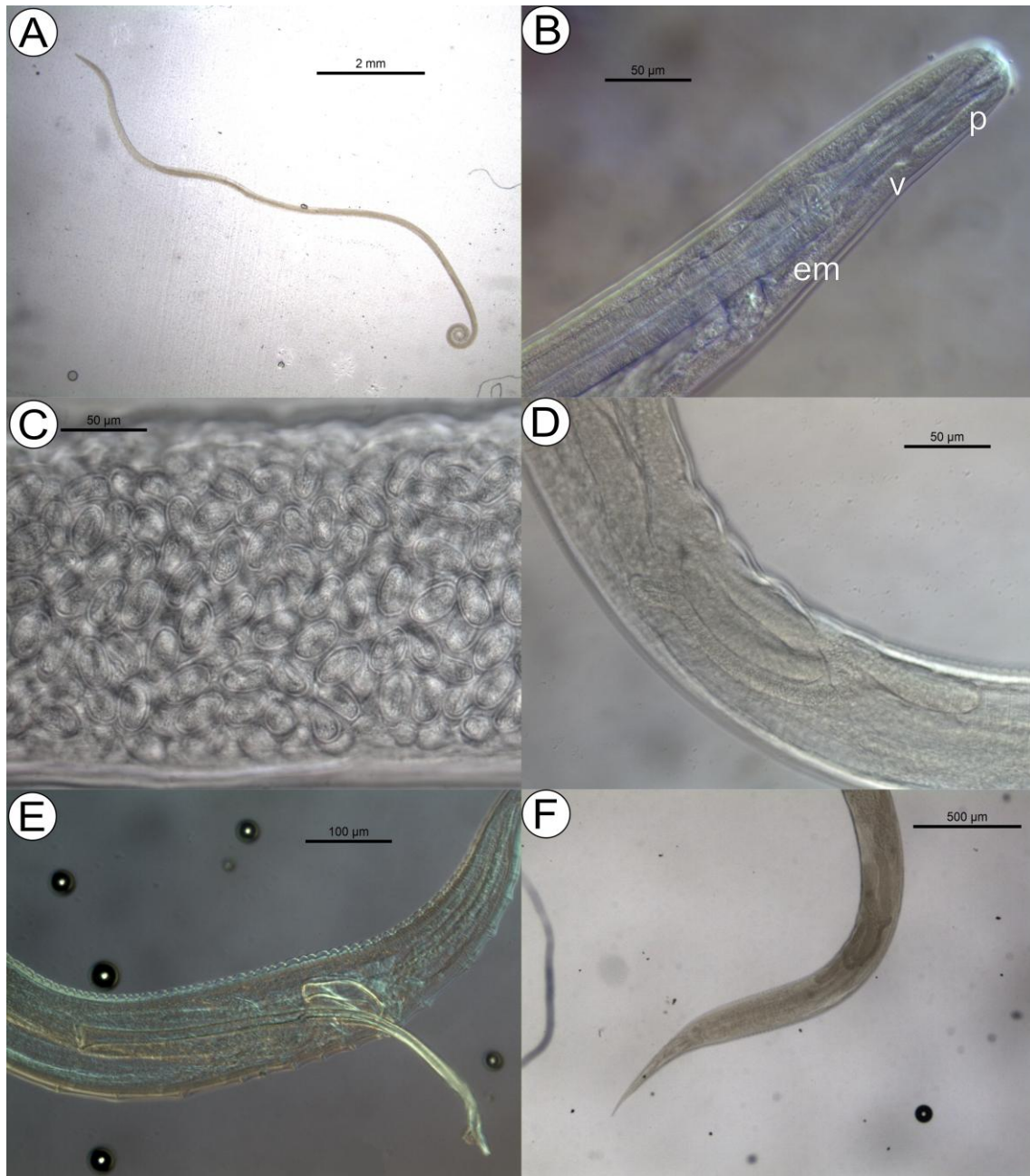


Figura 17. Espécimes de *Rhabdochona acuminata* (Molin, 1860) retirados dos intestinos de *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) procedente do Rio Pardo, Salto Grande, São Paulo. **(A)** Macho em visão total **(B)** Região anterior, destacando o prostômio (p), vestibulo (v) e esôfago muscular (em) **(C)** Ovos sem filamento **(D)** Vagina curvada em direção à região anterior **(E)** Região posterior de macho: espículos, cloaca, papilas caudais e cauda **(F)** Região posterior de fêmea: útero didelfo, vagina, ânus e cauda.

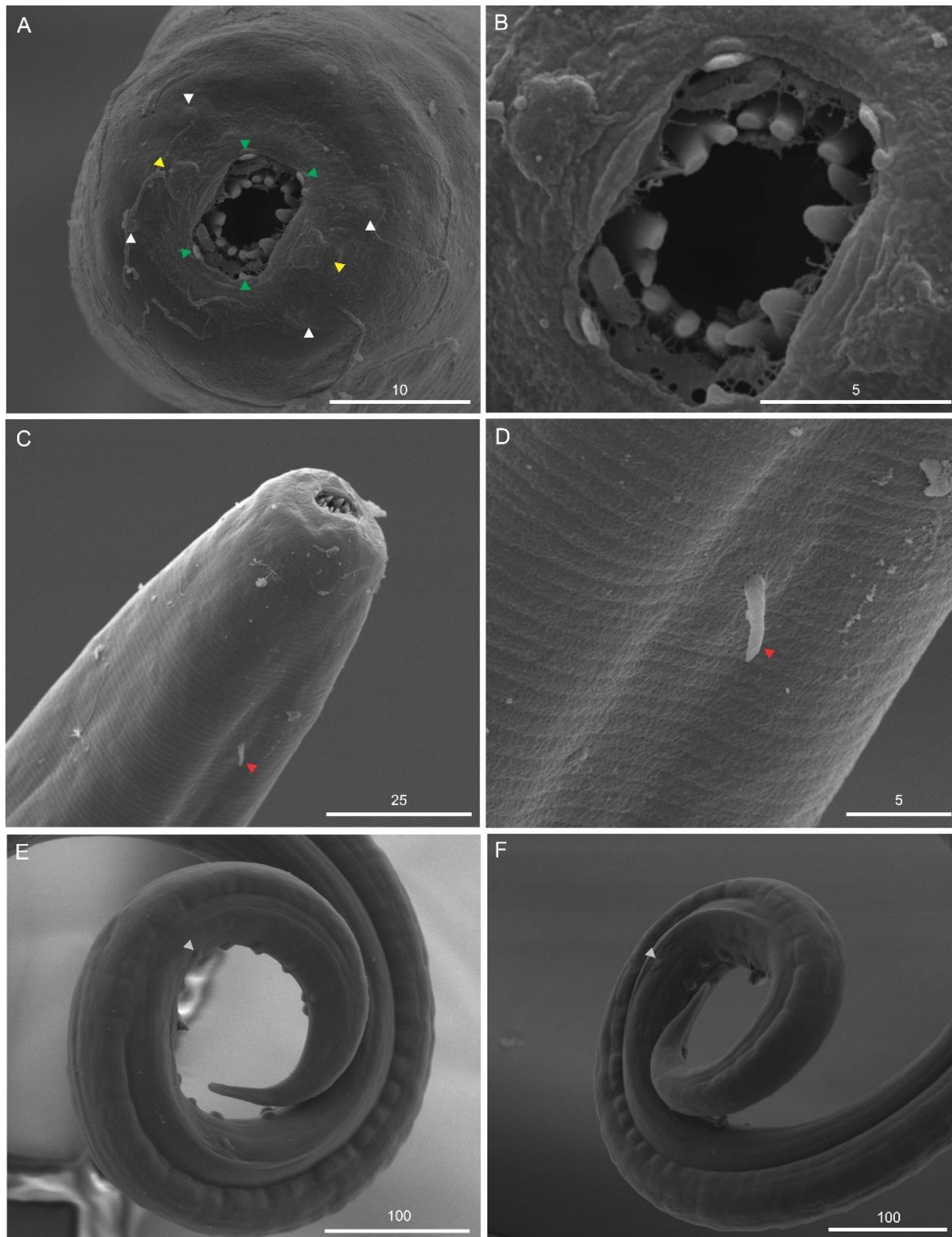


Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura de macho de *Rhabdochona acuminata* (Molin, 1860) retirado de intestino de *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) procedente do Rio Pardo, Salto Grande, São Paulo. **A e B:** Visão apical da extremidade cefálica: abertura oral em formato retangular; 14 dentes; quatro estruturas internas semelhantes a papilas (sinal verde); dois anfídios (sinal amarelo), ambos acompanhados de um adorno cuticular; quatro papilas cefálicas (sinal branco) **C e D:** Visão lateral da região cefálica: cutícula pouco estriada; deirídios simples **E e F:** Região posterior: cauda; cloaca; papilas pré-cloacais e papilas pós-cloacais: papilas laterais pré e pós-cloacais (sinal cinza).

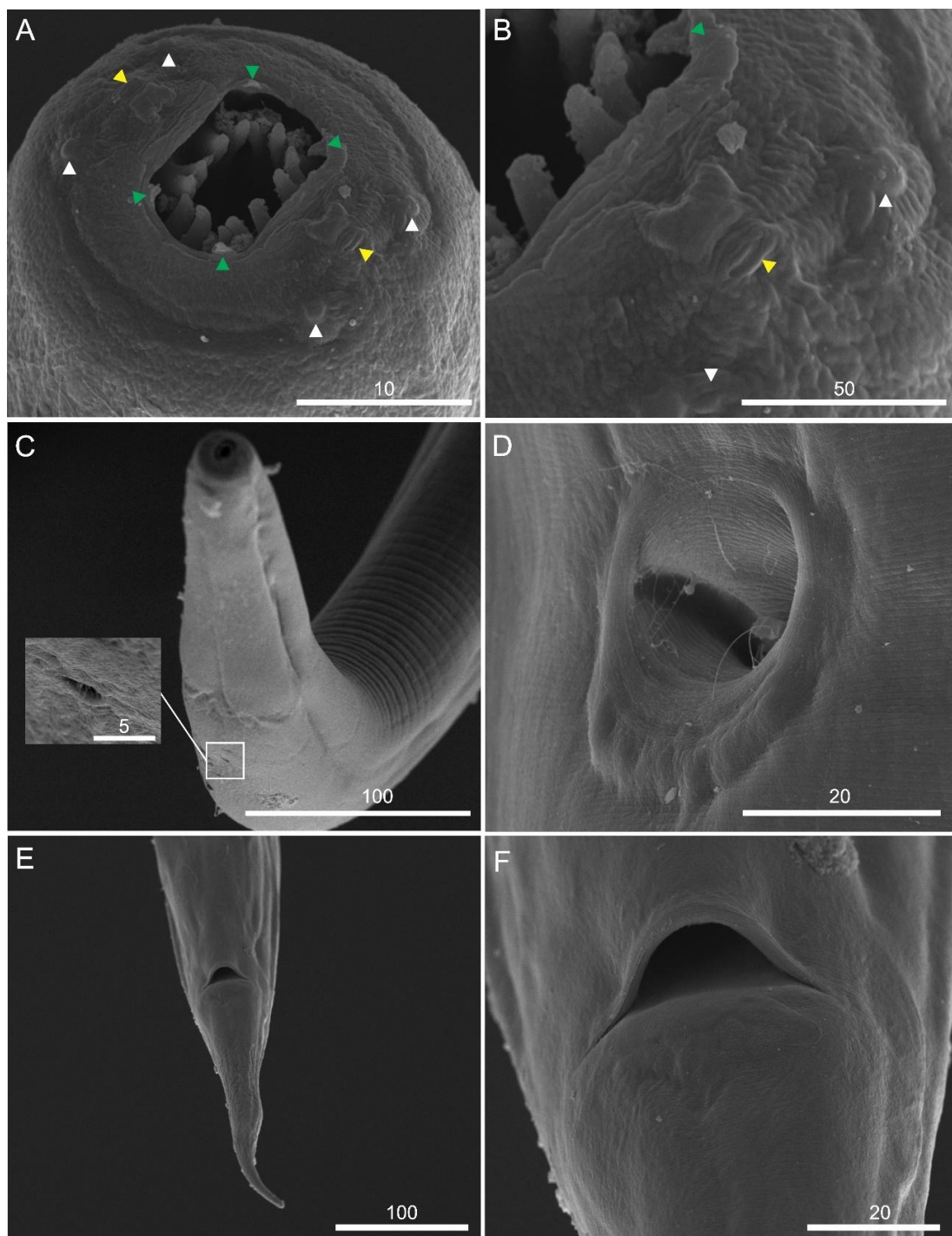


Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura de fêmea de *Rhabdochona acuminata* (Molin, 1860) retirado de intestino de *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) procedente do Rio Pardo, Salto Grande, São Paulo. **A:** Visão apical da extremidade cefálica: abertura oral em formato retangular; 14 dentes; quatro estruturas internas semelhantes a papilas (sinal verde); dois anfishídios (sinal amarelo), ambos acompanhados de um adorno cuticular; quatro papilas cefálicas (sinal branco). **B:** Detalhe do anfishídio e adorno. **C:** Visão apical da região cefálica, mostrando o poro excretor **D:** Vulva. **E e F:** Região posterior: cauda e ânus.

4.3. Análises de filogenia molecular

Filogenia de monopistocotilos (Figura 20)

Neste trabalho foram produzidas cinco sequências parciais do gene 28S rDNA de espécimes de *D. spirophallus* coletados das brânquias de *P. prolixa*. Foi realizado um alinhamento final contendo 31 sequências do gene 28S de diferentes espécies, a maioria delas pertencentes à família Dactylogyridae, incluindo as cinco sequências geradas por este estudo, compostas por 1.148 pares de base após o alinhamento e edição. As sequências de *Pseudorhabdosynochus epinepheli* (Yamaguti, 1938), *Pseudorhabdosynochus lantauensis* (Beverley-Burton & Suriano, 1981) e *Murraytrema pricei* Bychowsky & Nagibina, 1977, pertencentes à família Diplectanidae, foram utilizadas como grupo externo. As análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana resultaram em topologias de árvores semelhantes entre si, com a maioria dos clados bem suportados.

A reconstrução filogenética agrupou as cinco sequências de monopistocotilos de *P. prolixa* provenientes deste trabalho em um clado de alto suporte (1 / 100) contendo também a sequência *D. spirophallus* KY766954 como elemento mais basal. A análise de divergência molecular indicou que todas as cinco sequências do presente trabalho apresentavam uma distância de 0,00% entre si e uma distância de 0,29% entre elas e a sequência de *D. spirophallus* KY766954. O clado composto por essas seis sequências formou o ramo mais derivado de um grupo composto exclusivamente por espécies de *Demidospermus*, incluindo a espécie tipo: *Demidospermus anus* Suriano, 1983 (sequência KY766957) e tendo como integrante mais basal a sequência de *D. prolixus* (KY766955). A menor divergência dentro deste grupo, excluindo as divergências entre as seis sequências citadas anteriormente, foi de 7,93% entre *D. anus* (KY766957) e *D. prolixus* (KY766955), enquanto a maior divergência foi de 11,84% entre *Demidospermus rhinelepsi* Acosta, Scholz, Blasco-Costa, Alves & da Silva, 2017 (sequência MG001324) e as cinco sequências provenientes deste trabalho. *D. spirophallus* KY766954 apresentou a segunda maior distância dentro do grupo, divergindo 11,74% de *D. rhinelepsi* MG001324.

As sequências *Demidospermus* sp. 11 KP056235 e *Demidospermus* sp. 23 KP056236 formaram um clado de alto suporte, apresentando 4,96% de divergência entre si. O clado composto por essas duas sequências foi representado como o grupo-irmão de

um ramo contendo três sequências atualmente pertencentes a gêneros diferentes: *Demidospermus mortenthaleri* Mendoza-Palermo, Scholz, Mendoza-Franco & Kuchta, 2012 KP056245 *Walteriella ophiocirrus* Mendoza-Palmero, Mendoza-Franco, Acosta & Scholz, 2019 MK834515 e *Nanayella megorchis* (Mizelle & Kritsky, 1969) Acosta, Mendoza-Palmero, da Silva & Scholz, 2019 MK367407. A maior divergência entre essas três sequências foi de 16,09% entre *D. mortenthaleri* (elemento mais basal) e *N. megorchis* (elemento mais derivado). A topologia posicionou *W. ophiocirrus* entre as duas outras sequências, apresentando divergências similares: 12,80% e 12,60%, respectivamente.

Três sequências foram selecionadas como grupo externo: *M. pricei* DQ157672, *P. epinepheli* AY553622 e *P. lantauensis* AY553624. As duas sequências de espécies do gênero *Pseudorhabdosynochus* formaram entre si um clado de alto suporte (1/100), tendo *M. pricei* como clado irmão, também altamente suportado (1/100). A análise de divergência revelou as seguintes distâncias genéticas: *M. pricei* apresenta uma divergência de 22,77% em relação a *P. epinepheli* e de 23,25% em relação a *P. lantauensis*. Uma distância genética de 5,78% foi observada entre as duas espécies congêneres.

A maior divergência genética identificada em toda a análise foi de 39,24% entre o grupo externo *M. pricei* DQ157672 e *Cichlidogyrus mbirizei* Muterezi Bukinga, Vanhove, Van Steenberge & Pariselle, 2012 MG030378. *Murraytrema pricei* apresentou divergências similarmente altas em relação a *Demidospermus* sp. 23 KP056236 (38,60%) e *Heteropriapulus anchoradiatus* Acosta, Franceschini, Zago, Scholz & Silva, 2017 (38,86%). Por outro lado, as menores distâncias entre os grupos externos e as demais sequências foram observadas nas comparações entre *P. epinepheli* AY553622 e *Aphanoblastella magna* Yamada, Acosta, Yamada, Scholz & Da Silva, 2018 MH688484 (33,46%) e entre *P. lantauensis* e *A. magna* (33,86%).

Ignorando os valores de divergência envolvendo grupos externos, a análise de divergência passa a ter como maiores distâncias genéticas aquelas entre *C. mbirizei* MG030378 e *Demidospermus* sp. 23 KP056236 (36,03%), entre *C. mbirizei* e *Cosmetocleithrum laciniatum* Yamada, Yamada, Silva & Anjos, 2017 ON982796 (31,44%), e entre *Parasciadicleithrum octofasciatum* Mendoza-Palmero, Blasco-Costa, Hernández-Mena & Pérez-Ponce de León, 2017 KY305885 e *Demidospermus* sp. 23 KP056236 (36,93%)

Ignorando os valores de divergência envolvendo as cinco sequências provenientes deste trabalho e *D. spirophallus* KY766954, a menor divergência de toda a análise foi a de 4,96% entre *Demidospermus* sp. 11 e sp. 23 mencionada anteriormente. Outros exemplos de baixas divergências incluem 7,93% entre *D. anus* e *D. prolixus*, 12,27% entre *Unilatus unilatus* Mizelle & Kritsky, 1967 e *H. anchoradiatus*, e 14,16% entre *Trinigyrus peregrinus* Nitta & Nagasawa, 2016 e *U. unilatus*.

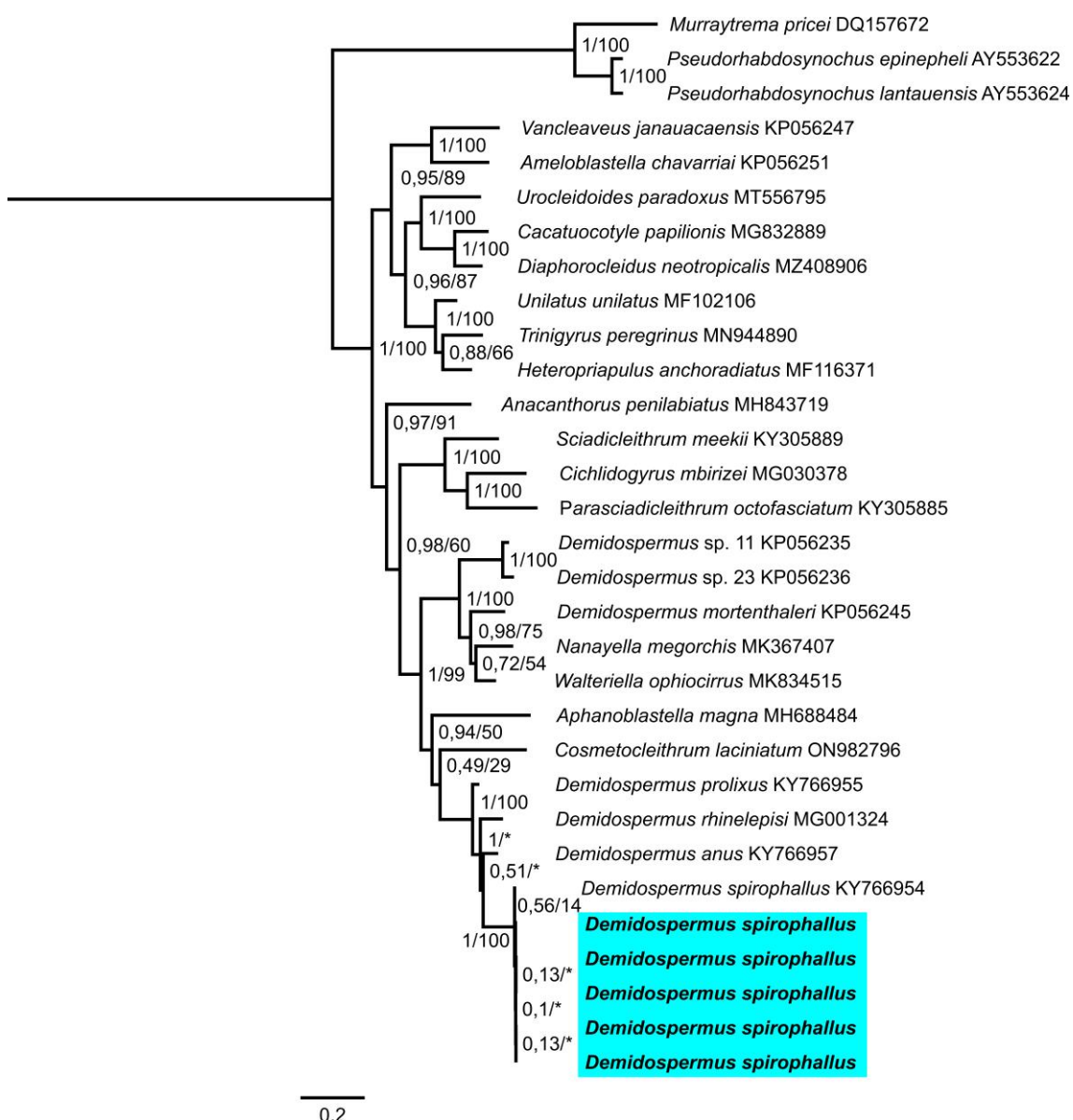


Figura 20. Árvore filogenética do gene 28S rDNA construída com sequências de monopistocotilos dactilogirídeos. A topologia é o resultado de inferência bayesiana. Os suportes dos ramos são indicados pelas probabilidades posteriores da inferência bayesiana e os valores de bootstrap correspondentes da máxima verossimilhança. Topologias

incongruentes são indicadas por um asterisco. As sequências de *Demidospermus spirophallus* produzidas por este trabalho estão indicadas em colorido.

Filogenia de metacercárias (Figura 21)

Neste trabalho foram produzidas cinco sequências parciais do gene 28S rDNA de espécimes de metacercárias de diplostomídeos: três coletadas dos olhos e duas coletadas das brânquias/cavidade oral de *P. prolixa*. Foi realizado um alinhamento final contendo 52 sequências do gene 28S de diferentes espécies, a maioria delas pertencentes à família Diplostomidae, incluindo as sequências geradas por este estudo, compostas por 1.221 pares de base após o alinhamento e edição. As análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana resultaram em topologias de árvores semelhantes entre si, com a maioria dos clados bem suportados.

Para o grupo externo, foram selecionadas cinco espécies da família Proterodiplostomidae: *Archaeodiplostomum overstreeti* Tkach, Achatz & Pulis, 2020; *Neocrocodilicola georgianus* (Byrd & Reiber, 1942); *Paraproterodiplostomum currani* Tkach, Achatz & Pulis, 2020; *Polycotyle ornata* Willemoes-Suhm, 1870; e *Pseudocrocodilicola americanensis* (Byrd & Reiber, 1942). As sequências usadas para representar essas espécies foram: *A. overstreeti* (MT622323–MT622325), *N. georgianus* (MT622333), *P. currani* (MT622369), *P. ornata* (MT622338), *P. americanensis* MT622354. A reconstrução filogenética posicionou *P. ornata* (MT622338) como elemento mais basal do grupo externo, e apresentou alto suporte em todos os ramos exceto entre no clado mais derivado, devido à baixa divergência (0,00%) entre as três sequências de *A. overstreeti* que o compõem. O maior valor de divergência dentro do grupo externo foi de 1,78% entre *N. georgianus* (MT622333) e *P. currani* (MT622369). Os valores de divergência do grupo externo com as outras sequências da análise variaram de 4,53% a 6,54%.

A reconstrução filogenética agrupou as três metacercárias coletadas dos olhos de *P. prolixa* em um clado contendo também todas as 13 sequências de *Austrodiplostomum compactum*. A análise de divergência genética indicou valores de divergência de 0,00% entre todas as sequências, exceto por *A. compactum* MF624788, que apresentou uma divergência de 0,09% com todas as outras 15 sequências. A baixa divergência dentro desse clado indica conspecificidade entre todas as 16 sequências.

As sequências identificadas como *Austrodiplostomum* sp. (MZ314150; MH373587 e MH373590;) e Diplostomidae sp. (KT728769 e KT728773) formaram um clado de alto suporte (1/90). As sequências KT728769, KT728773 e MH373590 apresentaram tanto as menores divergências dentro desse clado (0,00% entre si) quanto as maiores (0,35% entre elas e MH373587).

A análise formou um ramo composto exclusivamente por todas as sequências identificadas como espécies do gênero *Austrodiplostomum*: as 16 sequências de *Austrodiplostomum compactum*, formando o elemento mais derivado do ramo; as cinco sequências identificadas como *Austrodiplostomum* sp.; e a espécie *Austrodiplostomum mordax* Szidat & Nani, 1951 (sequência MH373582), posicionada como o elemento mais basal do ramo. A menor divergência dentro deste ramo foi de 0,00% entre as 16 sequências de *A. compactum*, enquanto a maior divergência foi de 1,25% entre *Austrodiplostomum* sp. KT728769 e *A. mordax* MH373582. A sequência de *A. mordax* exibiu valores de divergência comparativamente altos dentro desse ramo: 1,15% a 1,24% com *A. compactum* e 1,16% a 1,25% *Austrodiplostomum* sp.

A topologia da análise representou as espécies atualmente alocadas no gênero *Tylodelphys* em duas linhagens distintas, uma delas contendo *Tylodelphys clavata* (von Nordmann, 1832) (sequência PQ738921), a espécie tipo do gênero, e a outra formando um ramo contendo, em adição a *Tylodelphys* spp. um ramo composto por *Austrodiplostomum* spp, e as duas sequências de metacercárias de brânquias de *P. proluxa*: identificadas como Diplostomidae gen. sp. na posição mais basal do ramo. A análise de divergência exibiu divergências de 1,97% a 3,40% entre membros de ramos diferentes e de 0,00% a 1,70% ou 0,00% a 1,44% entre membros do mesmo ramo. A topologia e os valores de divergência são indicativos da não naturalidade do gênero *Tylodelphys*.

As duas sequências de Diplostomidae gen. sp. do presente trabalho formaram entre si um clado bem suportado (1/100), exibindo 0,00% de divergência genética entre si., mais basal em relação a todas as sequências de *Austrodiplostomum* spp. e mais derivado em relação a todas as sequências de *Tylodelphys* de sua linhagem. Os valores de divergência das duas amostras também se apresentaram de similares aos em relação a espécies de ambos os gêneros, variando de 1,00% a 1,42% em relação a *Austrodiplostomum* spp. e de 1,10% a 2,06% em relação a *Tylodelphys* spp.

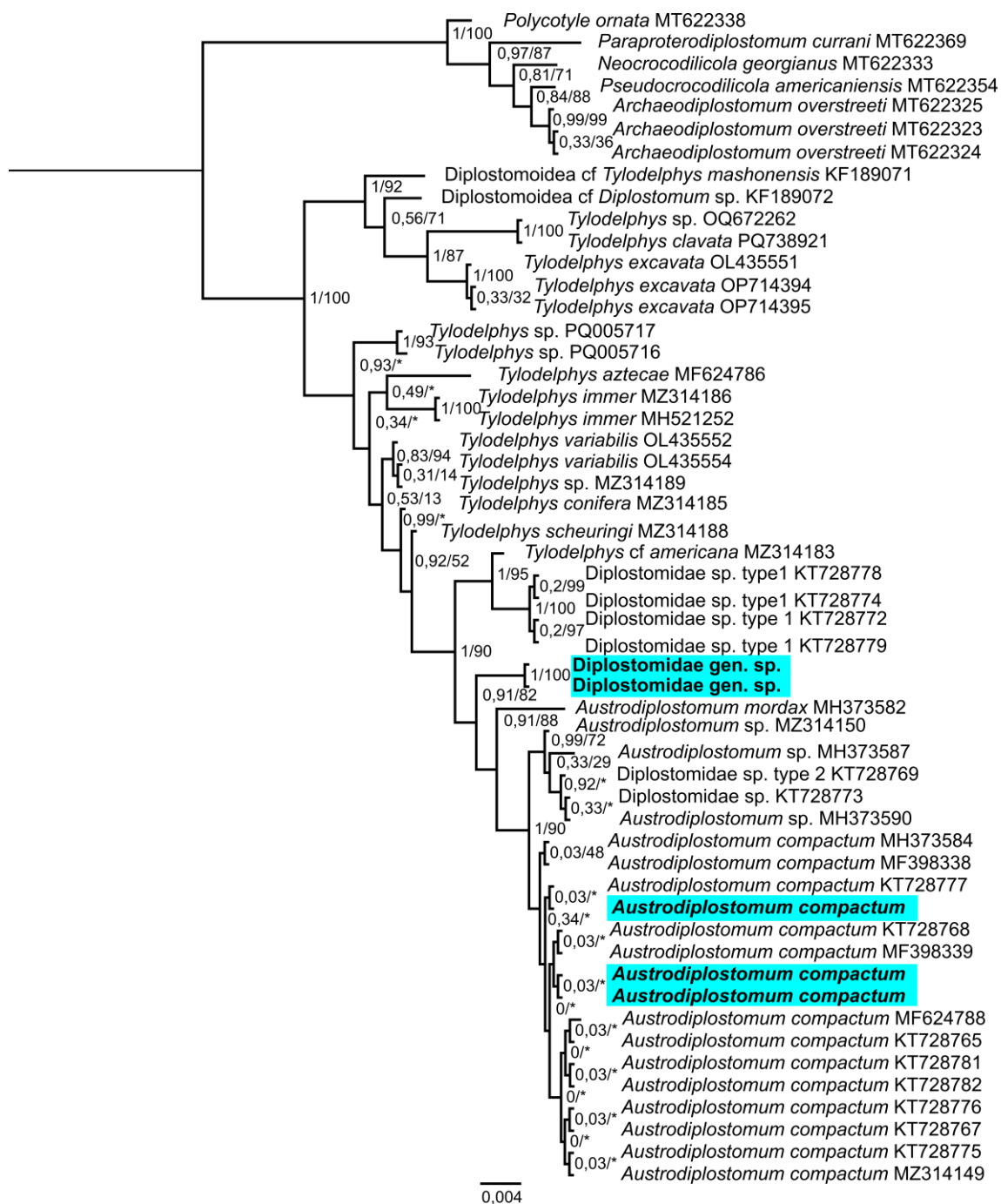


Figura 21. Árvore filogenética do gene 28S rDNA construída com sequências de diplostomídeos. A topologia é o resultado de inferência bayesiana. Os suportes dos ramos são indicados pelas probabilidades posteriores da inferência bayesiana e os valores de bootstrap correspondentes da máxima verossimilhança. Topologias incongruentes são indicadas por um asterisco. As três sequências de *A. compactum* e as duas sequências de *Diplostomidae* gen. sp. são indicadas em colorido.

5. DISCUSSÃO

A análise dos helmintos de *P. prolixa* no rio Pardo, município de Salto Grande, SP, mostrou que a comunidade parasitária foi constituída de 10 táxons. Há apenas dois estudos anteriores em que a fauna parasitária desta espécie de loricarídeo foi investigada. Franceschini (2016), estudando 50 exemplares do rio Sapucaí-Mirim, no município de São Joaquim da Barra, SP, encontrou sete táxons de helmintos, sendo dois monopistocotilos, um digenético e quatro nematoides. Já Pelegrini *et al.* (2018), estudando 40 exemplares do rio Batalha, municípios de Piratininga e Reginópolis, SP, relataram a presença de 11 táxons nos hospedeiros, sendo um monopistocotilo, quatro digenético e seis nematoides. Comparando com a fauna de helmintos obtida nestes três estudos, verificamos que apenas *D. spirophallus* e metacercárias de *Austrodiplostomum* sp. foram observados em indivíduos das três localidades. Espécies do gênero *Rhabdochona* também foram registradas, embora a identificação ao nível de espécie não foi apresentado por Franceschini (2016) enquanto Pelegrini *et al.* (2018) encontraram *R. kidderi* e *Rhabdochona* sp. Os demais táxons foram exclusivos de *P. prolixa* em cada localidade específica, demonstrando que o ambiente é um fator crucial na determinação da comunidade parasitária do hospedeiro. Estes dados reforçam a importância de se estudar hospedeiros em diferentes localidades geográficas para conhecimento da helmintos parasitos de determinada espécie animal.

No presente estudo, foram encontrados monopistocotilos exclusivamente das brânquias dos hospedeiros. Este dado é similar ao relatado por Franceschini (2016) enquanto Pelegrini *et al.* (2018), também relataram a ocorrência de monopistocotilos na pele. A análise morfológica deste trabalho, baseada em descrições prévias de dactilogirídeos (Ferrari-Hoeinghaus *et al.*, 2010; Mendoza-Palmero *et al.*, 2012; Yamada *et al.*, 2017, Franceschini *et al.*, 2018) constatou a presença de *D. spirophallus* e *D. prolixus* em *P. prolixa*, ambas já relatadas neste hospedeiro (Franceschini, 2016; Pelegrini *et al.*, 2018). O registro desses monopistocotilos no rio Pardo, amplia a área de geográfica de ocorrência dessas espécies para a bacia do Paranapanema.

Ainda em relação aos monopistocotilos, em um único hospedeiro foi encontrado um único indivíduo pertencente ao gênero *Demidospermus* que apresentou caracteres morfológicos distintos sugerindo tratar-se de uma espécie ainda não descrita. A espécie tem muita similaridade com *D. spirophallus*. O complexo copulatório e vagina entre as duas espécies possuem morfologias similares. Porém, o monopistocotilo encontrado neste

estudo possui diferenças morfológicas expressivas nas barras do haptor. A barra ventral possui extremidades bifurcadas, enquanto a dorsal termina com aspecto digitiforme, com três segmentos. Esse conjunto de características, difere este monopistocotilo de todas as espécies conhecidas para o gênero. Contudo, dada limitação de espécimes encontrados, a proposição desta nova espécie não foi possível. Estudos futuros, com novas coletas amostrais poderão ser conduzidos para tentar obter novos exemplares para a descrição da espécie.

Com relação aos parâmetros ecológicos associados aos monopistocotilos, constatamos que *D. spirophallus* foi a espécie de helminto mais prevalente (80%), abundante ($12,27 \pm 2,71$) e de maior intensidade de infecção ($15,33 \pm 3,09$) no presente estudo, estando presente em 22 dos 30 espécimes de *P. prolixa*. Apesar disso, os três parâmetros ecológicos apresentaram valores inferiores aos relatados em *P. prolixa* no rio Sapucaí-Mirim (Franceschini *et al.*, 2018) e no rio Batalha (Pelegrini *et al.*, 2018) (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros ecológicos de *Demidospermus spirophallus* relatados em *Proloricaria prolixa* (Isbrücker & Nijssen, 1978) no Brasil.

Prevalência (%)	Intensidade média $\pm$ EP	Abundância média $\pm$ EP	Sítio de infecção	Referência
80	$15,33 \pm 3,09$	$12,27 \pm 2,71$	Brânquias	Presente estudo
98	$92,50 \pm 10,50$	$90,70 \pm 10,50$	Brânquias	Franceschini <i>et al.</i> (2018)
89,7	$141,30 \pm 200,70$	$123,30 \pm 193,20$	Brânquias e superfície	Pelegrini <i>et al.</i> (2018)

A subclasse Digenea representou mais da metade dos táxons identificados neste estudo. As análises morfológicas revelaram cinco táxons de ocorrência inédita neste hospedeiro: *C. creptotrema*, Halipeginae gen. sp. e metacercárias de Diplostomidae gen. sp., *Diplostomum* sp. e *Tylodelphys* sp., além de confirmarem a presença de um táxon previamente reportado: metacercárias de *A. compactum*.

Creptotrema creptotrema é a espécie-tipo do gênero e foi descrita por Travassos *et al.* (1928) em *Megaleporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837), coletado na Cachoeira de Emas, Pirassununga, São Paulo. É um dignético que apresenta um par de papilas musculares ventrolaterais associadas à ventosa oral e útero que não alcança a região

posterior dos testículos. Esta espécie já foi registrada em vários hospedeiros, a saber: *Megaleporinus elongatus* (Valenciennes, 1850) (Kohn, A., 1984), *Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803 (Siluriformes, Pimelodidae) (Albuquerque *et al.*, 2016), *Conorhynchus conirostris* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae) (Brasil-Sato & Santos, 2005), e *Tetragonopterus chalceus* Spix & Agassiz, 1829 (Characiformes, Characidae) (Kohn & Fróes, 1986). Apesar de ter sido encontrado parasitando o intestino de um único hospedeiro, este é o primeiro registro de *C. creptotrema* em hospedeiro da família Loricariidae, especificamente em *P. prolixa*, ampliando assim a gama de hospedeiros para este digenético, demonstrando assim a baixa especificidade do parasito que, incluindo o registro do presente estudo, já foi relatado em hospedeiros de três diferentes famílias (Kohn, A., 1984; Kohn & Fróes, 1986; Brasil-Sato & Santos, 2005; Albuquerque *et al.*, 2016; Franceschini *et al.*, 2021).

No presente estudo foi encontrado um único exemplar de digenético pertencente à subfamília Halipeginae, família Derogenidae. Na América do Sul, as espécies registradas de Halipeginae pertencem principalmente aos gêneros *Genarchella* Travassos, Artigas & Pereira, 1928 e *Thometrema* Amato, 1968 (Amato, 1968; Kohn *et al.* 1990, 2007; Tsuchida *et al.*, 2021a,b). As espécies de *Thometrema* se caracterizam por apresentarem um ducto hermafrodita que se estende bem para fora do saco sinusal, enquanto em *Genarchella*, o ducto hermafrodita está inteiramente dentro do saco sinusal (Gibson, 2002; Kohn *et al.* 1990). O único exemplar coletado no presente estudo estava com o útero repleto de ovos, principalmente na região da bolsa do saco sinusal, o que impediu a alocação do digenético em um desses dois gêneros de Halipeginae. *Thometrema* spp. tem sido registrado em uma grande diversidade de peixes dos gêneros *Percichthys*, *Steindachneridion*, *Potamotrygon*, *Pimelodus*, *Rhamdia*, *Salminus*, *Pseudoplatystoma*, *Psalidodon*, *Astyanax*, *Megaleporinus obtusidens*, *Oligosarcus*, *Ageneiosus*, *Auchenipterus*, *Luciopimelodus*, *Sorubim*, *Zungaro*, *Australoheros* e *Odontesthes* (Alves *et al.*, 2025), enquanto que *Genarchella*, tem registros em peixes dos gêneros *Acestrorhynchus*, *Ageneiosus*, *Astyanax*, *Auchenipterus*, *Cheirodon*, *Cynopotamus*, *Hexanematichthys*, *Jenynsia*, *Leporinus*, *Loricariichthys*, *Luciopimelodus*, *Moenkhausia*, *Oligosarcus*, *Pimelodella*, *Pimelodus*, *Pseudoplatystoma*, *Rhamdia*, *Roeboides*, *Salminus*, *Sorubim*, *Triportheus* e *Zungaro* (Kohn *et al.*, 2007). Apesar da ampla distribuição e gama de hospedeiros de *Thometrema* spp. e *Genarchella* spp., não há registro de ocorrência desses parasitos em espécies de *Proloricaria*. Dessa forma, o

presente estudo representa um importante registro de novo hospedeiro para este grupo de helmintos.

Os indivíduos de *P. prolixa* do rio Pardo também apresentaram infecção com quatro diferentes tipos de metacercárias de digenéticos: *A. compactum*, Diplostomidae gen. sp., *Diplostomum* sp. e *Tylodelphys* sp. Essas metacercárias fazem parte da família Diplostomidae e são conhecidas por seus ciclos de vida heteroxênicos envolvendo múltiplos hospedeiros, geralmente um molusco de água doce como primeiro hospedeiro intermediário, seguido de um peixe como segundo hospedeiro intermediário, em que o parasito se desenvolve até o estágio de metacercária, encerrando o ciclo de vida no hospedeiro definitivo, geralmente uma ave piscívora, na qual o parasito se desenvolve até a fase adulta e se reproduz (Zhokhov, 2014; García-Varela *et al.*, 2016b; Rosser *et al.*, 2016; Locke *et al.*, 2020). Há um número elevado de estudos referindo a ocorrência de metacercárias de diplostomídeos em peixes, incluindo as do gênero *Proloricaria* (Franceschini, 2016; Pelegrini *et al.*, 2018). Os estudos moleculares têm revelado diversidade críptica e novos táxons dentro de Diplostomidae, reforçando a importância de análises integrativas para a elucidação da história evolutiva desse grupo (García-Varela *et al.*, 2016b; Locke *et al.*, 2020). Nossos achados relataram uma diversidade de diplostomídeos maior que previamente relatada em *P. prolixa*, destacando o papel dessa espécie como hospedeira intermediária no ciclo biológico de uma ampla gama de digenéticos parasitos de aves.

O presente trabalho é o primeiro relato de infecção por *R. acuminata* em *P. prolixa*, tendo sido encontrados machos e fêmeas adultos em seis dos 30 hospedeiros. A identificação destes parasitos foi feita a partir de critérios morfológicos e morfométricos, conforme descrições prévias dessa espécie (Costa *et al.*, 2011; Cremonte *et al.*, 2002; Gallas *et al.*, 2019) e de suas congêneres (Moravec *et al.*, 2012; Lagunas-Calvo *et al.*, 2019; Santacruz *et al.*, 2019; Alcantara *et al.*, 2021). O primeiro registro de espécies de *Rhabdochona* parasitando *P. prolixa* foi feito por Franceschini (2016), em espécimes provenientes do rio Sapucaí-Mirim, São Joaquim da Barra, SP. A autora encontrou um único hospedeiro, dentre os 50 analisados, parasitado com 10 nematoides os quais foram identificados ao nível de gênero. Posteriormente, Pelegrini *et al.* (2018), relataram larvas não identificadas de *Rhabdochona* sp. e adultos de *R. kidderi* parasitando o intestino de *P. prolixa*. Na fase adulta, *R. kidderi* é morfologicamente similar a *R. acuminata*: ambas possuem a mesma abertura oral em formato de retângulo ovalado, com quatro sublabiais submediais e cercada por um par de anfídios laterais e quatro papilas cefálicas

submediais; ambas espécies possuem 14 dentes dispostos exatamente na mesma configuração (três dorsais, três ventrais, dois pares laterais adjacentes à margem dorsal e dois pares laterais adjacentes à margem ventral); As fêmeas de ambas as espécies apresentam ovos larvados lisos de formato oval e desprovidos de filamentos; os machos das duas espécies apresentam alargamentos na ponta distal do espículo esquerdo semelhantes, embora esse alargamento possua um formato bifurcado nos machos de *R. kidderi* enquanto os machos de *R. acuminata* apresentam uma ornamentação em forma de bota, em que o “bico” da bota é formado pelo gancho dorsal curvo e o “salto” é a asa membranosa ventral. A diferença morfológica mais conspícua entre essas duas espécies é o formato dos deirídios, que são simples e cônicos em *R. acuminata* e bifurcados em *R. kidderi*, lembrando um par de asas (Cremonte *et al.*, 2002; Moravec *et al.*, 2012). Dada a similaridade entre as espécies, este trabalho obteve dados morfométricos (Tabela 3) do material de *R. kidderi* depositado por Pelegrini e colaboradores na Coleção Helminológica do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu (CHIBB) para comparação com os *R. acuminata*. Adicionalmente, foram produzidas imagens de microscopia eletrônica de varredura: os nematoides do presente trabalho apresentaram um conjunto de caracteres morfológicos (Figuras 18 e 19), particularmente o espículo em forma de bota, os deirídios cônicos e simples, e a configuração de papilas sinônimos com a espécie *R. acuminata*, confirmando o diagnóstico a nível específico. Portanto, o presente estudo reportou, de maneira inédita, a infecção de *P. prolixa* pela espécie *R. acuminata*, ampliando a lista de espécies do gênero que parasita espécies de *Proloricaria*.

Tabela 3. Morfometria de *Rhabdochona acuminata* (Molin, 1860) (presente trabalho) e *Rhabdochona kidderi* Pearse, 1936 (Pelegriini *et al.*, 2018) parasitos de *Proloricaria proluxa*. **S:** Sexo, **CT:** Comprimento total, **L:** Largura, **P:** Comprimento do prostômio, **VP:** Comprimento vestíbulo + prostômio, **EM:** comprimento do esôfago muscular, **EG:** comprimento do esôfago glandular, **AN:** distância do anel nervoso à extremidade anterior, **PE:** Distância do poro excretor à extremidade anterior, **D:** Distância dos deirídios à extremidade anterior, **EE:** Comprimento do espículo esquerdo, **ED:** Comprimento do espículo direito, **C:** Distância do ânus/cloaca à extremidade posterior, **V:** Distância da vulva à extremidade posterior, **CO:** Comprimento médio dos ovos e **LO:** Largura média dos ovos.

	Presente trabalho		Pelegriini <i>et al.</i> (2018)	
S	Macho (N = 3)	Fêmea (N =1)	Macho (N =1)	Fêmea (N =1)
CT (mm)	10,05 (8,08 – 11,72)	18,94	7,69	13,75
L	115,25 (79,96-133,13)	240,47	134,39	208,78
P	24,10 (20,46-26,79)	30,27	20,41	23,65
VP	140,90 (111,22-178,47)	130,71	132,30	133,28
EM	384,15 (339,15-413,11)	482,795	297,32	311,17
EG	1682,20 (1101,28-2115,82)	2.168,32	1623,19	1757,86
AN	206,70 (192,11-222,03)	256	189,32	233,31
PE	286,396	318,08	-	-
D	66,86	-	-	-
EE	529,31 (515,72-538,32)	-	555,08	-
ED	98,90 (97,25-100,13)	-	104,99	-
PRÉ	10 a 12	-	-	-
PÓS	10	-	-	-
C	409,02 (367,83-450,22)	421,4	293,03	332,37
V	-	1.613,77	-	5.572,83
CO	-	25,12	-	23,10
LO	-	16,31	-	13,23

Tomados em conjunto, os dados obtidos no presente estudo, nomeadamente, a descrição de novas relações de parasitismo, representam uma importante contribuição para o conhecimento da fauna de helmintos parasitos que acometem espécies de peixes na região Neotropical.

Este trabalho produziu duas filogenias baseados no gene 28S rDNA: uma de monopistocotilos e outra de digenéticos. Foram produzidas sequências parciais do gene 28S rDNA de três dos dez táxons relatados: cinco sequências de *Demidospermus spirophallus*, três sequências de *Austrodiplostomum compactum* e duas sequências de Diplostomidae gen. sp.

A análise molecular de monopistocotilos produziu uma filogenia similar às de Franceschini *et al.* (2018) e Acosta *et al.* (2018), confirmando as discussões dos autores dos trabalhos prévios a respeito da não naturalidade do gênero *Demidospermus*; do pertencimento das espécies *D. anus*, *D. spirophallus* e *D. prolixus* ao gênero *Demidospermus sensu stricto*; da necessidade de reclassificação das espécies *D. mortenthaleri*, *Demidospermus* sp. 11 e *Demidospermus* sp. 23; da associação entre as espécies do gênero *Demidospermus sensu stricto* com hospedeiros da família Loricariidae no Brasil e a correlação entre os monopistocotilos incorretamente alocados nesse gênero e os hospedeiros de outras famílias da ordem Siluriformes, notavelmente com peixes da família Pimelodidae no Peru; a necessidade de eleger um novo gênero para acomodar *D. mortenthaleri* e outro para *Demidospermus* sp. 11 e *Demidospermus* sp. 23 (Mendoza-Palmero *et al.*, 2012; Mendoza-Palmero *et al.*, 2015; Acosta *et al.*, 2018; Franceschini *et al.*, 2018).

A espécie *D. rhinelepsi* se manteve pertencente a *Demidospermus sensu stricto* na análise atual, conforme demonstrado pelos descritores da espécie (Acosta *et al.*, 2018). Nesta análise de matriz de divergência, os três clados agrupados artificialmente em *Demidospermus* apresentaram valores de divergência entre si similares aos do trabalho anterior, indicando a proximidade do gênero *Demidospermus sensu stricto* aos gêneros *Aphanoblastella* e *Cosmetocleithrum*. No entanto, a adição das sequências de *Nanayella megorchis* e *Walteriella ophiocirrus* gerou uma informação relevante a respeito da filogenia desses dois clados, cuja reclassificação será necessária no futuro.

Os cinco espécimes de monopistocotilos cujas sequências foram produzidas neste trabalho não apresentaram nenhuma divergência genética entre si (0,00%) e apresentaram uma divergência de 0,29% entre eles e a sequência de *D. spirophallus* produzida pelo trabalho anterior, configurando a menor divergência de toda a análise e confirmando a sua conspecificidade. As menores divergências interespecíficas de toda a análise foram: 5,78% entre duas espécies congêneres de diplectanídeos que compunham o grupo externo da análise; 7,93% entre *D. prolixus* e *D. anus*; e 4,96% entre *Demidospermus* sp. 11 e *Demidospermus* sp. 23. As divergências entre *Demidospermus sensu stricto* e as três

espécies incorretamente alocadas nesse gênero variaram entre 20,82% e 26,44%, valores similares aos produzidos pelo artigo de descrição de *D. rhinelepsi*. Conforme os dados da atual análise de divergência, esses valores são condizentes com as distâncias entre espécies de gêneros distintos da mesma família, confirmando a não naturalidade do gênero *Demidospermus*.

Pela análise morfológica, foram identificadas metacercárias de quatro táxons parasitando *P. proluxa*: *A. compactum* nos olhos; Diplostomidae gen. sp. exclusivamente nas brânquias, e *Diplostomum* sp. e *Tylodelphys* sp. nas brânquias e nos lavados de cavidade oral e visceral. Das cinco amostras separadas para análises moleculares, três corresponderam a *A. compactum* dos olhos e duas de Diplostomidae gen. sp. exclusivamente nas brânquias. O resultado da filogenia demonstrou o agrupamento das cinco sequências de metacercárias produzidas pelo presente trabalho com outras sequências de espécies da família Diplostomidae e indicou que as amostras pertenciam a dois táxons distintos, em concordância com a análise morfológica.

As três sequências geradas de *Austrodiplostomum compactum* dos olhos foram agrupadas em um clado que continha também todas as 13 sequências de *A. compactum* obtidas a partir do Genbank. As relações filogenéticas entre as 16 sequências dentro deste clado apresentaram baixa divergência intraespecífica (0,09% entre *A. compactum* MF624788 e todas as outras sequências) ou nula (0,00% entre todas as sequências exceto *A. compactum* MF624788). Esse resultado indicou a conspecificidade do clado e comprovou a identificação das três novas sequências como *A. compactum*.

O clado composto pelas sequências de *A. compactum* possuía como grupo irmão um ramo composto por cinco sequências de espécies não identificadas do gênero *Austrodiplostomum*. Os valores de divergência dentro deste clado foram de 0,00% a 0,35% e os valores de divergência interespecífica com relação às sequências de *A. compactum* foram de 0,17% a 0,53%. Assim como mencionado por Achatz *et al.* (2022), a delimitação de relações filogenéticas dentro do gênero *Austrodiplostomum* é particularmente desafiadora. Nossa análise molecular corrobora essa afirmação pelos baixos valores de divergência dessas sequências entre si e entre elas e o clado de *A. compactum*. A ampla distribuição dos helmintos desse gênero no continente americano, sendo transportados por longas distâncias em seus hospedeiros definitivos (as aves aquáticas) e a mutação infrequente de genes, conforme mencionada por Achatz *et al.* (2022), podem permitir o fluxo gênico entre diferentes linhagens, assim retardando a especiação dentro desse clado. Trabalhos futuros a respeito desse gênero poderão fazer

uso da análise de haplótipos para investigar essa possibilidade de fluxo gênico ativo entre linhagens distintas, como foi demonstrado por García-Varela *et al.* (2016a). Embora os valores de divergência dentro do clado de espécies ainda não descritas de *Austrodiplostomum* sejam notadamente baixos, a topologia indicou, de maneira razoavelmente suportada, a formação de duas ou três linhagens dentro desse clado que divergiam entre si tanto quanto divergiam com *A. compactum*. Em outras palavras, caso seja comprovado o pertencimento qualquer uma dessas cinco sequências a uma espécie diferente de *A. compactum*, o resultado poderá ser a proposição de mais de uma nova espécie dentro do gênero.

Embora os valores de divergência comparativamente baixos entre *Austrodiplostomum* sp. e *A. compactum* evidenciem a dificuldade de delimitação de espécies dentro do gênero, as divergências entre esses táxons e a espécie-tipo do gênero, *A. mordax*, foram similarmente altas: 1,16%–1,25% e 1,15%–1,24%, respectivamente. No presente momento, apenas duas espécies encontram-se válidas no gênero: *A. compactum* e *A. mordax*. Embora tenha sido discutida no passado uma sinonimização entre esses dois táxons, a validade de ambas como espécies distintas foi estabelecida com base em evidências moleculares (Núñez, 2017; Hernández-Mena *et al.*, 2019; Achatz *et al.*, 2022), o que é suportado pela filogenia deste trabalho.

A identificação taxonômica baseada exclusivamente em caracteres morfológicos, conforme discutido por Achatz *et al.* (2022), tem contribuído para a atual não monofilia do gênero *Tylodelphys*. Essa não monofilia foi evidenciada pela topologia da análise filogenética, que formou ramos distintos de espécies atualmente agrupadas no gênero. O clado composto por *Austrodiplostomum* spp. foi posicionado dentro de um dos ramos de *Tylodelphys* spp. (aquele que não continha a espécie-tipo *Tylodelphys clavata*), evidenciando a não naturalidade do gênero. A análise de divergência corrobora esse resultado apresentando divergências de 1,97% a 3,40% entre membros de ramos diferentes e de 0,00% a 1,70% ou 0,00% a 1,44% entre membros do mesmo ramo.

As duas amostras obtidas a partir de metacercárias presentes nas brânquias foram agrupadas em outro clado bem suportado, mais basal em relação a todas as sequências de *Austrodiplostomum* e mais derivado em relação a todas as sequências de *Tylodelphys* de sua linhagem. Os valores de divergência das duas amostras também se apresentaram de similares aos em relação a espécies de ambos os gêneros, variando de 1,00% a 1,42% em relação a *Austrodiplostomum* spp. e de 1,10% a 2,06% em relação a *Tylodelphys* spp. O

diagnóstico dessas duas sequências é portanto, incerto, em consequência da delimitação imprecisa entre os gêneros e da ausência de dados morfológicos para essas amostras.

A análise molecular baseada no gene 28S de helmintos digenéticos neste trabalho produziu as seguintes informações: confirmação molecular da identificação de metacercárias de *A. compactum* em *Proloricaria prolixa*; inclusão de dados moleculares de metacercárias de Diplostomidae gen. sp. em *P. prolixa*, apresentando igual similaridade com espécies dos gêneros *Austrodiplostomum* e *Tylodelphys*; evidência da não monofilia de *Tylodelphys* e das relações filogenéticas dentro do gênero *Austrodiplostomum*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação de mestrado teve como objetivo identificar os helmintos de *P. prolixa* no rio Pardo, determinar os parâmetros de cada relação de parasitismo e realizar análises filogenéticas com base nos dados moleculares obtidos. Este trabalho obteve um total de 30 espécimes hospedeiros, nos quais foram coletados um total de 488 helmintos pertencentes a dez táxons diferentes, sete dos quais representaram relações de parasitismo inéditas. Apesar do conjunto de parasitos encontrados neste hospedeiro ser diferente daquele relatado por trabalhos anteriores em outros rios, a variedade de espécies encontradas foi similar. Os valores de prevalência apresentados pelas relações de parasitismo neste trabalho foram comparativamente baixos em relação à literatura, com quatro dos 30 hospedeiros completamente desprovidos de parasitos. Este trabalho produziu imagens de microscopia do que pode se tratar de uma nova espécie do gênero *Demidospermus* e produziu evidências da não monofilia dos gêneros *Demidospermus* e *Tylodelphys* com base em filogenia molecular.

7. REFERÊNCIAS

- Achatz, T. J., Martens, J. R., Kostadinova, A., Pulis, E. E., Orlofske, S. A., Bell, J. A., Fecchio, A., Oyarzún-Ruiz, P., Syrota, Y. Y., & Tkach, V. V. (2022). Molecular phylogeny of *Diplostomum*, *Tylodelphys*, *Austrodiplostomum* and *Paralaria* (Digenea: Diplostomidae) necessitates systematic changes and reveals a history of evolutionary host switching events. *International Journal for Parasitology*, 52(1), 47–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.06.002>
- Acosta, A. A., Scholz, T., Blasco-Costa, I., Alves, P. V., & Silva, R. J. (2018). A new genus and two new species of dactylogyrid monogeneans from gills of Neotropical catfishes (Siluriformes: Doradidae and Loricariidae). *Parasitology International*, 67(1), 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.09.012>
- Albert, J. S., & Reis, R. E. (2011). Introduction to Neotropical freshwaters. In J. S. Albert & R. E. Reis (Eds.), *Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes*. University of California Press. <https://doi.org/10.1525/california/9780520268685.003.0001>
- Albuquerque, M. C., Santos-Clapp, M. D., & Brasil-Sato, M. C. (2016). Endoparasites of two species of forage fish from the Três Marias reservoir, Brazil: New host records and ecological indices. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38, 139–145.
- Alcantara, E. P., Úngari, L. P., Ferreira-Silva, C., Emmerich, E., Da Silva Pinheiro, R. H., O'Dwyer, L. H., & Silva, R. J. (2021). *Rhabdochona fuscovaria* sp. n. (Nematoda: Rhabdochonidae) from the stomach of frog *Scinax fuscovarius* (Anura: Hylidae) in Brazil. *Zootaxa*, 5067(4), 569–584. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5067.4.5>
- Alves, P. V., Ebert, M. B., & Silva, R. J. (2025). Far from home: Morphological, ultrastructural, and molecular characterization of *Thometrema patagonicum* (Szidat, 1956) (Hemiuroidea: Derogenidae) from an unexpected host and locality, with taxonomic implications. *Journal of Helminthology*, 99, e52. <https://doi.org/10.1017/S0022149X25000355>
- Amato, J. F. R. (1968). Contribuição ao conhecimento da fauna helmintológica do Rio Grande do Sul: Um novo parasito de peixe cascudo *Plecostomus commersoni* (Cuv. & Val.) (Trematoda: Hemiuroidea). *Revista Brasileira de Biologia*, 28, 433–438.
- Bertaco, V. A., Ferrer, J., Carvalho, F. R., & Malabarba, L. R. (2016). Inventory of the freshwater fishes from a densely collected area in South America: A case study of the current knowledge of Neotropical fish diversity. *Zootaxa*, 4138(3), 401–440. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4138.3.1>

- Borchert, A., & Cordero del Campillo, M. (1975). *Parasitología veterinaria* (2ª ed.). Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Brabec, J., Salomaki, E. D., Kolísko, M., Scholz, T., & Kuchta, R. (2023). The evolution of endoparasitism and complex life cycles in parasitic platyhelminths. *Current Biology*, 33(19), 4269–4275.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.08.064>
- Brasil-Sato, M. C., & Santos, M. D. (2005). Metazoan parasites of *Conorhynchos conirostris* (Valenciennes, 1840), an endemic siluriform fish of the São Francisco basin, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 14, 160–166.
- Brooks D. R. & Hoberg (2001). Parasite systematics in the 21st century: opportunities and obstacles. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(Suppl. 1), 99–107. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762000000700018>
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., & Shostak, A. W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of parasitology*, 83(4), 575–583.
- CBH-MP – Comitê Da Bacia Hidrográfica Do Médio Paranapanema. *Plano de Bacia da Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Médio Paranapanema*. Caderno Síntese. São Paulo: CBH-MP, 2007.
- Costa, D. P. C., De Albuquerque, M. C., & Brasil-Sato, M. C. (2011). *Rhabdochona* (*Rhabdochona*) *acuminata* (Nematoda) in fishes (Characiformes, Acestrorhynchidae) from the Três Marias reservoir, Upper São Francisco River, Brazil. *Neotropical Helminthology*, 5(1), 16–23. <https://doi.org/10.24039/rnh2011511031>
- Covain, R., Fisch-Muller, S., Oliveira, C., Mol, J. H., Montoya-Burgos, J. I., & Dray, S. (2016). Molecular phylogeny of the highly diversified catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) reveals incongruences with morphological classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94 (Pt B), 492–517. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.10.018>
- Cremonte, F., Navone, G. T., Gosztonyi, A. E., & Kuba, L. (2002). Redescription of *Rhabdochona* (*Rhabdochona*) *acuminata* (Nematoda: Rhabdochonidae) from freshwater fishes from Patagonia (Argentina), the geographical implications. *Journal of Parasitology*, 88(5), 934–941. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0934:RORRAN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0934:RORRAN]2.0.CO;2)
- Dagosta, F. C. P., Monção, M. S., Nagamatsu, B. A., Pavanelli, C. S., Carvalho, F. R., Lima, F. C. T., Langeani, F., Dutra, G. M., Ota, R. R., Seren, T. J., Tagliacollo, V., Menezes, N. A., Britski, H. A., & Pinna, M. (2024). Fishes of the upper rio Paraná basin: Diversity,

- biogeography and conservation. *Neotropical Ichthyology*, 22(1), e230066.
<https://doi.org/10.1590/1982-0224-2023-006>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Davydenko, T. V., & Nikishin, V. P. (2024). Tissue organization of the male reproductive system of the acanthocephalan *Acanthocephalus tenuirostris* (Palaeacanthocephala, Echinorhynchida). *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 51, 1974–1983.
<https://doi.org/10.1134/S1062359024700493>
- Drew, L. W. (2011). Are we losing the science of taxonomy? As need grows, numbers and training are failing to keep up. *BioScience*, 61(12), 942–946.
<https://doi.org/10.1525/bio.2011.61.12.4>
- Eiras, J. C., Takemoto, R. M., & Pavanelli, G. C. (2006). *Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes* (2ª ed., 199 p.). EDUEM.
- Eiras, J. C., Takemoto, R. M., & Pavanelli, G. C. (2010). *Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil* (333 p.). Clichetec.
- Eiras, J. C., Takemoto, R. M., Pavanelli, G. C., & Adriano, E. A. (2011). About the biodiversity of parasites of freshwater fish from Brazil. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 31, 161–168.
- Ferrari-Hoeinghaus, A. P., Bellay, S., Takemoto, R. M., & Floriano, A. M. M. (2010). A new species of *Demidospermus* Suriano, 1983 (Monogenea, Dactylogyridae) parasitic on *Loricariichthys platymetopon* Isbrücker et Nijssen (Loricariidae, Siluriformes) from the Upper Paraná River floodplain, Brazil. *Acta Parasitologica*, 55(1), 16–19.
<https://doi.org/10.2478/s11686-010-0007-5>
- Franceschini, L. Biodiversidade de parasitas de peixes da família Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) procedentes do rio Sapucaí-Mirim, Brasil. Tese de doutorado em Ciências Biológicas (Zoologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2016
- Franceschini, L., Aguiar, A., Zago, A. C., De Oliveira Fadel Yamada, P., Bertholdi Ebert, M., & Silva, R. J. (2021). Three new species of *Creptotrema* (Trematoda, Allocreadiidae) with an amended diagnosis of the genus and reassignment of *Auriculostoma* (Allocreadiidae), based on morphological and molecular evidence. *Parasite*, 28, 69.
<https://doi.org/10.1051/parasite/2021065>

- Franceschini, L., Zago, A. C., Müller, M. I., Francisco, C. J., Takemoto, R. M., & Silva, R. J. (2018). Morphology and molecular characterization of *Demidospermus spirophallus* n. sp., *D. prolixus* n. sp. (Monogenea: Dactylogyridae) and a redescription of *D. anus* in siluriform catfish from Brazil. *Journal of Helminthology*, 92(2), 228–243. <https://doi.org/10.1017/S0022149X17000256>
- Froese, R., & Pauly, D. (2024). *FishBase* (versão 06/2024) [Base de dados online]. Recuperado de <https://www.fishbase.org>
- Gallas, M., Calegario-Marques, C., & Amato, S. B. (2019). First report of *Rhabdochona acuminata* (Nematoda, Rhabdochonidae) in *Astyanax* aff. *fasciatus* (Characiformes, Characidae) from Lake Guaíba, southern Brazil. *Neotropical Biology and Conservation*, 14(4), 479–488. <https://doi.org/10.3897/neotropical.14.e49025>
- García-Varela, M., Sereno-Uribe, A. L., Pinacho-Pinacho, C. D., Domínguez-Domínguez, O., & Pérez-Ponce de León, G. (2016a). Molecular and morphological characterization of *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen, 2009 (Digenea: Diplostomatidae), a parasite of cormorants in the Americas. *Journal of Helminthology*, 90(2), 174–185. <https://doi.org/10.1017/S0022149X1500005X>
- García-Varela, M., Sereno-Uribe, A. L., Pinacho-Pinacho, C. D., Hernández-Cruz, E., & Pérez-Ponce de León, G. (2016b). An integrative taxonomic study reveals a new species of *Tylodelphys* Diesing, 1950 (Digenea: Diplostomidae) in central and northern Mexico. *Journal of Helminthology*, 90(6), 668–679. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000917>
- Gibson, D. I. (2002). Family Derogenidae Nicoll, 1910. In D. I. Gibson, A. Jones, & R. A. Bray (Eds.), *Keys to the Trematoda* (Vol. 1, pp. 351–368). CAB International & The Natural History Museum.
- Goater, T. M., Goater, C. P., & Esch, G. W. (2014). Parasitism: *The diversity and ecology of animal parasites* (2^a ed.). Cambridge University Press.
- Grossi, C.H. (2003). Sistema de informação geográfica-Basins 3.0 na modelagem hidrológica da bacia experimental do Rio Pardo, SP. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas.
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5), 696–704. <https://doi.org/10.1080/106351503902355207>
- Hernández-Mena, D. I., García-Varela, M., & Pérez-Ponce de León, G. (2019). Assessing the taxonomic validity of *Austrodiplostomum* spp. (Digenea: Diplostomidae) through nuclear

- and mitochondrial data. *Journal of Parasitology*, 105(1), 57–65. <https://doi.org/10.1645/18-51>
- Jarduli, L. R., Garcia, D. A. Z., Vidotto-Magnoni, A. P., Casimiro, A. C. R., Vianna, N. C., Almeida, F. S., Jerep, F. C., & Orsi, M. L. (2020). Fish fauna from the Paranapanema River basin, Brazil. *Biota Neotropica*, 20(1), e20180707. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2018-0707>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kohn, A. (1984). Redescription of the type-material of *Creptotrema creptotrema* Travassos, Artigas & Pereira, 1928 (Digenea, Allocreadiidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79(3), 377–379. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761984000300014>
- Kohn, A., & Fróes, O. M. (1986). *Saccocoelioides godoyi* n. sp. (Haploporidae) and other trematodes parasites of fishes from the Guaíba Estuary, RS, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81, 67–72.
- Kohn, A., Fernandes, B. M. M., & Cohen, S. C. (2007). *South American trematodes parasites of fishes*. Rio de Janeiro: Imprinta.
- Kohn, A., Fernandes, B. M. M., & Fróes, O. M. (1990). On the Brazilian species of halipegine genera (Trematoda: Derogenidae) from fishes, with new morphological data, hosts and synonyms. *Systematic Parasitology*, 16, 201–211.
- Kritsky, D. C., Thatcher, V. E., & Boeger, W. A. (1986). Neotropical Monogenea. 8. Revision of *Urocleidoides* (Dactylogyridae, Ancyrocephalinae). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 53, 1–37.
- Lagunas-Calvo, O., Santacruz, A., Hernández-Mena, D. I., Rivas, G., Pérez-Ponce de León, G., & Aguilar-Aguilar, R. (2019). Taxonomic status of *Rhabdochona ictaluri* (Nematoda: Rhabdochonidae) based on molecular and morphological evidence. *Parasitology Research*, 118(2), 441–452. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6189-8>
- Locke, S. A., Al-Nasiri, F. S., Caffara, M., Drago, F., Kalbe, M., Lapierre, A. R., McLaughlin, J. D., Nie, P., Overstreet, R. M., Souza, G. T., Takemoto, R. M., & Marcogliese, D. J. (2015). Diversity, specificity and speciation in larval Diplostomidae (Platyhelminthes: Digenea) in the eyes of freshwater fish, as revealed by DNA barcodes. *International Journal for Parasitology*, 45(13), 841–855. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.07.001>

- Locke, S. A., Drago, F. B., Núñez, V., Souza, G. T. R. E., & Takemoto, R. M. (2020). Phylogenetic position of *Diplostomum* spp. from New World herons based on complete mitogenomes, rDNA operons, and DNA barcodes, including a new species with partially elucidated life cycle. *Parasitology Research*, 119(7), 2129–2137. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06713-4>
- Logez, M., Bouraï, L., Hette-Tronquart, N., & Argillier, C. (2025). Ecological vulnerability of aquatic ecosystems — A review. *Environmental Management*, 75(2), 192–204.
- Lymbery, A. J., & Smit, N. J. (2023). Conservation of parasites: A primer. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 21, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.07.001>
- MacKenzie, K., Williams, H. H., Williams, B., McVicar, A. H., & Siddall, R. (1995). Parasites as indicators of water quality and the potential use of helminth transmission in marine pollution studies. *Advances in Parasitology*, 35, 85–144. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60070-6](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60070-6)
- Mendoza-Palmero, C. A., Blasco-Costa, I., & Scholz, T. (2015). Molecular phylogeny of Neotropical monogeneans (Platyhelminthes: Monogenea) from catfishes (Siluriformes). *Parasites & Vectors*, 8, 164. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0767-8>
- Mendoza-Palmero, C. A., Scholz, T., Mendoza-Franco, E. F., & Kuchta, R. (2012). New species and geographical records of dactylogyrids (Monogenea) of catfish (Siluriformes) from the Peruvian Amazonia. *Journal of Parasitology*, 98(3), 484–497. <https://doi.org/10.1645/GE-2941.1>
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)* (pp. 1–8). New Orleans, LA, USA. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>
- Moravec, F. (1998). *Nematodes of freshwater fishes of the Neotropical Region* (464 pp.).
- Moravec, F., Salgado-Maldonado, G., González-Solís, D., & Caspeta-Mandujano, J. M. (2012). Host-parasite relationships of *Rhabdochona kidderi* Pearse, 1936 (Nematoda: Rhabdochonidae) in fishes of the Lacantún River in the Lacandon rain forest of Chiapas State, southern Mexico, with a key to Mexican species of *Rhabdochona* Railliet, 1916. *Systematic Parasitology*, 82(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11230-012-9342-2>
- Müller, M. I., Morais, D. H., Costa-Silva, G. J., Aguiar, A., Ávila, R. W., & Silva, R. J. (2018). Diversity in the genus *Rhabdias* (Nematoda, Rhabdiasidae): Evidence for cryptic speciation. *Zoologica Scripta*, 47, 1–13. <https://doi.org/10.1111/zsc.12304>

- Núñez, M. O. (2017). Redescription of *Austrodiplostomum compactum* (Trematoda: Diplostomidae) from its type host and locality in Venezuela, and of *A. mordax* from Argentina. *Journal of Parasitology*, 103(5), 497–505. <https://doi.org/10.1645/16-128>
- Ota, R. R., Deprá, G. de C., da Graça, W. J., & Pavanelli, C. S. (2018). Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes: Revised, annotated and updated. *Neotropical Ichthyology*, 16(2). <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170094>
- Pelegrini, L. S., Gião, T., Vieira, D. H. M. D., Müller, M. I., da Silva, R. J., de León, G. P., de Azevedo, R. K., & Abdallah, V. D. (2019). Molecular and morphological characterization of the metacercariae of two species of diplostomid trematodes (Platyhelminthes, Digenea) in freshwater fishes of the Batalha River, Brazil. *Parasitology Research*, 118(7), 2169–2182. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06362-2>
- Pelegrini, L. S., Januário, F. F., Azevedo, R. K. de, & Abdallah, V. D. (2018). Biodiversity and ecology of the parasitic infracommunities of *Loricaria prolixa* (Siluriformes: Loricariidae) from the Tietê-Batalha Basin, SP, Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 40(1), e36294. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v40i1.36294>
- Peron, A. F., & Piroli, E. L. (2011). *Projeto APPs: Conhecendo e cuidando da bacia hidrográfica do Rio Pardo*. CEDIAP-GEO - Centro de Estudos e Divulgação de Informações sobre Áreas Protegidas, Bacias Hidrográficas e Geoprocessamento.
- Pinheiro, V. H. P. (2023). Revisão das espécies nominais do gênero *Proloricaria* Isbrücker, 2001 (Siluriformes: Loricariidae, Loricariinae): Um caso de aplicação de taxonomia integrativa [Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de São Carlos]. Repositório Institucional da UFSCar. <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/8630373>
- Poulin, R., & Morand, S. (2004). *Parasite biodiversity*. Smithsonian Institution Press. Washington, DC.
- Prado, P. I., & Lewinsohn, T. (2002). *Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento* (3ª ed.). Editora Contexto. <https://app.minhabiblioteca.com.br/books/9788572442305>
- Rambaut, A. (2009). *FigTree* (versão 1.3.1) [Programa de computador]. Recuperado de <http://tree.bio.ed.ac.uk>
- Rey, L. (2008). *Parasitologia: parasitas e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais* (4ª ed.). Guanabara Koogan. 883p.
- Rezende, J. M. (1999). Parasito, parasita. *Revista de Patologia Tropical*, 28(1), 87–90.

- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rosser, T. G., Alberson, N. R., Khoo, L. H., Woodyard, E. T., Pote, L. M., & Griffin, M. J. (2016). Characterization of the life cycle of a fish eye fluke, *Austrodiplostomum ostromskiae* (Digenea: Diplostomidae), with notes on two other diplostomids infecting *Biomphalaria havanensis* (Mollusca: Planorbidae) from catfish aquaculture ponds in Mississippi, USA. *Journal of Parasitology*, 102(2), 260–274. <https://doi.org/10.1645/15-850>
- Salvador-Júnior, L. F., Salvador, G. N., & Santos, G. B. (2009). Morphology of the digestive tract and feeding habits of *Loricaria lentiginosa* Isbrücker, 1979 in a Brazilian reservoir. *Journal of Comparative Physiology B*, 179(2), 101–109. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2008.00336.x>
- Santacruz, A., Ornelas-García, C. P., & Pérez-Ponce de León, G. (2019). Diversity of *Rhabdochona mexicana* (Nematoda: Rhabdochonidae), a parasite of *Astyanax* spp. (Characidae) in Mexico and Guatemala, using mitochondrial and nuclear genes, with the description of a new species. *Journal of Helminthology*, 94, e34. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000014>
- Sela, I., Ashkenazy, H., Katoh, K., & Pupko, T. (2015). GUIDANCE2: accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W7–W14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv318>
- Stamatakis A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Travassos, L., Artigas, P., & Pereira, C. (1928). Fauna helminthologica dos peixes de água doce do Brasil. *Archivos do Instituto Biológico São Paulo*, 1, 5-68.
- Tsuchida, K., Flores, V., Viozzi, G., Rauque, C., & Urabe, M. (2021a). Hemiuroidean trematodes from freshwater Patagonian fishes: Description of a new species, distribution and molecular phylogeny. *Parasitology Research*, 120, 1219–1232.

- Tsuchida, K., Urabe, M., Viozzi, G., Rauque, C., & Flores, V. (2021b). A new species of hemiuroidean trematode from *Hatcheria macraei* (Siluriformes, Trichomycteridae) and *Heleobia hatcheri* (Gastropoda, Cochliopidae) in a Patagonian River. *Parasitology Research*, 120, 2523–2532.
- Tundisi, J. G., Tunisi, T. M., & Rocha, O. (2006). Ecossistemas de águas interiores. In A. C. Rebouças, B. Braga, & J. G. Tundisi (Eds.), *Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação* (pp. 749). São Paulo.
- Zhang, Z.-Q. (2013). Animal biodiversity: An update of classification and diversity in 2013. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) *Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness* (Addenda 2013). *Zootaxa*, 3703(1), 5–11. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3703.1.3>
- Zhokhov, A. E. (2014). Metacercariae of new trematode species of the genus *Diplostomum* (Trematoda, Diplostomidae) from fishes of Lake Tana, Ethiopia. *Inland Water Biology*, 7(1), 15–24. <https://doi.org/10.1134/S1995082914010167>