

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 30/08/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CÂMPUS BOTUCATU

PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

TESE DE DOUTORADO

**Caracterização morfológica e molecular de trematódeos
(Digenea) parasitos de peixes Characiformes provenientes da
bacia do Rio Tietê, São Paulo, Brasil**

Karina Gabriele Alves Dias

Botucatu – SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CÂMPUS BOTUCATU

PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

**Caracterização Morfológica e Molecular de trematódeos
(Digenea) parasitos de peixes Characiformes provenientes da
bacia do Rio Tietê, São Paulo, Brasil**

Karina Gabriele Alves Dias

Orientadora: Vanessa Doro Abdallah Koslowiski

Tese apresentada ao Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Botucatu, São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

Botucatu, SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Dias, Karina Gabriele Alves.

Caracterização morfológica e molecular de trematódeos (Digenea) parasitos de peixes Characiformes provenientes da bacia do Rio Tietê, São Paulo, Brasil / Karina Gabriele Alves Dias. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vanessa Doro Abdallah Koslowiski

Capes: 21302022

1. Peixes de água doce. 2. Parasitos. 3. Characiformes.
4. Relação hospedeiro-parasito.

Palavras-chave: Digenéticos; Gene 28S; ITS; Peixes de água doce; Região Neotropical.

“Que nada nos limite. Que nada nos defina. Que nada nos sujeite. Que a liberdade seja a nossa própria substância”

Simone de Beauvoir

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelos momentos felizes e difíceis em minha vida, mas essencialmente por me abençoar com saúde e conhecimento.

Aos meus pais Régis e Melita, minha irmã Melissa e minha avó Imperatriz (in memoriam) pelo apoio, me incentivando a nunca desistir e mostrando que a educação sempre foi a melhor herança que eles podiam me proporcionar, além do enorme carinho e amor que sempre me foi dado durante todos os anos da minha vida. Sem vocês eu não seria nada.

Ao meu querido noivo, Arthur (Messi) pelo companheirismo, pelo carinho e amor que sempre me deu quando eu mais precisei, pelos bons conselhos que me ajudaram a me tornar uma pessoa melhor, por ser meu porto seguro e amor da minha vida. Sem você eu não teria conseguido.

A minha cachorrinha Miki que virou estrelinha recentemente. Você me mostrou o amor mais puro, verdadeiro e altruísta. Obrigada por ter sido a melhor companheira que eu poderia ter.

A minha orientadora, pelas oportunidades, ensinamentos e pela confiança em meu trabalho. Isto contribuiu muito para o meu crescimento e amadurecimento profissional.

Ao Gerardo Pérez-Ponce de León, Maria Isabel Müller e Mariana Ebert Bertoldi que me auxiliaram no árduo aprendizado na área da biologia molecular. Obrigada pela paciência, parceria e pela disposição em me ensinar.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, por todos os anos de ensinamentos desde a época de graduação, ao programa de Pós-graduação em Ciências

Biológicas (Zoologia) pelos conhecimentos científicos e a CAPES pelo apoio financeiro concedido durante esses anos.

Aos meus amigos de Laboratório pela convivência diária, pelas histórias malucas e divertidas, por todas as risadas e companheirismos que fizeram o meu dia a dia de pós graduanda muito mais leve. Obrigado pelo apoio e pela amizade, levarei vocês para sempre comigo.

A cidade de Botucatu, por ter me acolhido tão bem durante esses onze anos e por fazer me sentir em minha própria casa. Pela experiência de morar em vários lugares, repúblicas e conviver com pessoas tão diferentes. Pelas amizades que conquistei e por conhecer o amor da minha vida. Foi nela que vivi os melhores anos da minha vida.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que me apoiaram e incentivaram direta ou indiretamente para a concretização do meu trabalho.

Sumário

SUMÁRIO

1. RESUMO	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUÇÃO GERAL	5
3.1 Rios e seus afluentes	6
3.2 Peixes Characiformes.....	8
3.3 Parasitos de peixes	9
3.4 Digenéticos	10
3.5 Biologia Molecular	14
4. OBJETIVOS	18
5. MATERIAL E MÉTODOS	20
5.1 Coleta dos hospedeiros.....	21
5.2 Coleta dos parasitos	26
5.3 Análises Morfológicas	26
5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	26
5.5 Análises Moleculares.....	27
5.6 Análises Filogenéticas.....	28
6. REFERÊNCIAS.....	30
7. Capítulo: Molecular characterization of <i>Magnivitellinum saltaensis</i> (Digenea: Alloglossidiidae) in <i>Astyanax lacustris</i> (Characiformes: Characidae) from Brazil	41
7.1 Abstract.....	42
7.2 Introduction	43

7.3 Material and Methods.....	46
7.4 Results	52
7.5 Discussion.....	57
7.6 References	59
7.7 Supplementary Material	65
 8. Anexo I: A new species of <i>Creptotrematina</i> (Trematoda: Allocreadiidae) from characid fishes of Brazil: morphological and molecular data	 66
8.1 Supplementary Material	68
 9. Anexo II: A new species of <i>Wallinia</i> Pearse, 1920 (Digenea: Allocreadiidae) collected from <i>Astyanax fasciatus</i> (Cuvier, 1819) and <i>A. lacustris</i> Lucena and Soares, 2016 (Characiformes: Characidae) in Brazil based on morphology and DNA sequences	 71
9.1 Supplementary Material	73
 10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	 77

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécies de peixes coletados no rio Batalha, rio Jacaré-Pepira e rio Jacaré-Guaçu, Estado de São Paulo, Brasil. **(a)** *Astyanax lacustris* Lucena e Soares, 2016; **(b)** *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819)22
- Figura 2.** Rio Tietê e seus afluentes. Pontos de coleta com suas respectivas localidades: rio Jacaré-Guaçu e rio Jacaré-Pepira em Ibatinga e rio Batalha em Bauru, Piratininga e Reginópolis, Estado de São Paulo, Brasil. Imagem adaptada

disponível online no Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo (SigRH).....	23
3. Figura 3. Locais de coleta dos hospedeiros. (a) rio Batalha, no município de Piratininga (22°24'46''S; 49°05'05''W); (b) rio Jacaré-Pepira, no município de Ibitinga (21°53'30.5''S; 48°48'33.0''W); (c) rio Jacaré Guaçu, no município de Ibitinga (21°49'05.3''S; 48°54'23.7''W).....	24

Capítulo

1. Figure 1. Phylogenetic relationships based on 28S gene sequences from <i>Magnivitellinum saltaensis</i> (Brazil) and some members of the Plagiorchiidae group. Support values are in the nodes (bootstrap for ML with 1000 repetitions). Asterisks represent branches not supported by <70. The branch length scale bar indicates the number of replacements per site. The species <i>Creptotrematina batalhensis</i> (MT512642) was used as an outgroup	53
2. Figure 2. Phylogenetic relationships based on ITS sequences from <i>Magnivitellinum saltaensis</i> (Brazil) and some members of the Plagiorchiidae group. Support values are in the nodes (bootstrap for ML with 1000 repetitions). Asterisks represent branches not supported by <70. The branch length scale bar indicates the number of replacements per site. The species <i>Creptotrematina batalhensis</i> (MT512641) was used as an outgroup	54

Supplementary Material

3. Figure 3. Molecular voucher of <i>Magnivitellinum saltaensis</i> Davies, Liquin, Lauthier, Párraga, Saravia, Davies and Ostrowski de Núñez, 2021 from <i>Astyanax</i>	
---	--

<i>lacustris</i> Lucena and Soares, 2016 collected in the Jacaré-Pepira River, Ibitinga, São Paulo, Brazil.....	65
---	----

Anexo I

Supplementary Material

1. **Figure 1.** Molecular voucher of *Wallinia brasiliensis* n. sp. (number: INPA 784) from *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) collected in the Batalha River, Piratininga, São Paulo, Brazil68
2. **Figure 2.** Ventral view of holotype (number: INPA 782) of *Wallinia brasiliensis* n. sp. collected from *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) from the Batalha River, Piratininga, São Paulo, Brazil69
3. **Figure 3.** Scanning electron microscopy of *Wallinia brasiliensis*.n. sp. collected from *Astyanax lacustris* Lucena and Soares, 2016 from the Batalha River, Piratininga, São Paulo, Brazil **a.** Ventral view of the oral sucker and acetabulum. **b.** Detail pointed out by the arrows of the oral sucker without papillae70

Anexo II

Supplementary Material

1. **Figure 1.** Molecular voucher of *Creptotrematina batalhensis* n. sp. (number: INPA 813) from *Astyanax lacustris* Lucena and Soares, 2016 collected in the Batalha River, State of São Paulo, Brazil73
2. **Figure 2.** Paratype Ventral view of *Creptotrematina batalhensis* n. sp. collected from the intestine of *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) in the Batalha River, Piratininga, State of São Paulo, Brazil.....74

3. **Figure 3.** *Creptotrematina batalhensis* n. sp. from *Astyanax lacustris* Lucena and Soares 2016 and *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) collected in the Batalha River, Piratininga, São Paulo State, Brazil. Ventral view of the paratype specimen from *Astyanax lacustris* paratype75
4. **Figure 4.** Oral sucker with a pair of ventrolateral muscle papillae from *Creptotrematina batalhensis* n. sp. Scanning electron microscopy: arrow indicating a pair of ventrolateral muscle papillae76

LISTA DE TABELAS

1. **Tabela 1.** Lista da biodiversidade de Trematódeos encontrados em *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) e *Astyanax lacustris* Lucena e Soares, 2016, organizados em ordem alfabética de acordo com o seu gênero16

Capítulo

1. **Table I.** Record of *Magnivitellinum simplex*, *Magnivitellinum corvitellinum*, and *Magnivitellinum saltaensis* according to their hosts, localities and references ...45
2. **Table II.** Parasite species and their respective families, hosts, locality, GenBank accession number and the parasite sequence references used in the 28S rDNA gene phylogenetic analysis49
3. **Table III.** Parasite species and their respective families, hosts, locality, GenBank accession number and the parasite sequence references used in the ITS rDNA phylogenetic analysis.....51
4. **Table IV.** Genetic divergence expressed as percentage (Kimura 2 parameters), estimated using the partial 28S rDNA gene between specimens from the

Plagiorchioidea group and the external group <i>Ceptotrematina batalhensis</i> (MT512642).....	55
5. Table V. Genetic divergence expressed as percentage (Kimura 2 parameters), estimated using the ITS between specimens from the Plagiorchioidea group and the external group <i>Creptotrematina batalhensis</i> (MT512641).....	56

1. *Resumo*

RESUMO

O rio Tietê é o curso d'água mais importante do Estado de São Paulo e possui o rio Batalha como um de seus mais importantes afluentes. Apesar disso, o rio Batalha, bem como o rio Jacaré-Guaçu, se encontram cada vez mais poluídos devido a ações antrópicas, enquanto outros afluentes, como o rio Jacaré-Pepira, possuem águas consideradas de boa qualidade. Com isso, atualmente são crescentes os trabalhos que analisam os impactos destes problemas, como, por exemplo, o estudo da fauna parasitária dos peixes destes rios. Os trematódeos digenéticos parasitam todas as classes de vertebrados e são encontrados em vários órgãos e tecidos, sendo sua taxonomia, principalmente para as fases larvais, de reconhecimento extremamente difícil. Além de serem inseridos em diferentes famílias e gêneros marcadas por diversas mudanças na literatura, também são evidenciados por descrições antigas. Com isso, o uso de técnicas moleculares para diagnose pode ser mais eficiente quando comparadas as tradicionais metodologias taxonômicas, principalmente para espécies com pouca variação inter-específica. Deste modo, o uso da biologia molecular como ferramenta adicional aos estudos de caracterização morfológica e para o estudo evolutivo entre os grupos de parasitos, através das hipóteses filogenéticas, são de extrema importância para veracidade da diagnose de gênero e espécie. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi utilizar as técnicas de taxonomia tradicional e de biologia molecular para identificação de novas espécies de digenéticos de peixes da ordem Characiformes em três trechos do rio Tietê. Além disso, evidenciar, através de análises filogenéticas, novas relações parasitos-hospedeiro, a correta alocação dos espécimes dentro de suas respectivas famílias e novos registros de localidade e hospedeiros para a literatura.

Palavras-chave: Digenéticos, gene 28S, ITS, peixes de água doce, região Neotropical.

2. Abstract

ABSTRACT

The Tietê River is the most important river in the São Paulo State and the Batalha River is considered one of the most important tributaries of this River. However, the Batalha River has been increasingly polluted. Other tributaries of the Tietê River, like the Jacaré-Pepira River have good quality waters, while the Jacaré-Guaçu River is well impacted by anthropic actions. Considering this, studies that analyze these problems are increasing, as in the case of fish parasites. Digenean trematodes parasitize all classes of vertebrates and are found in various organs and tissues. The study of their taxonomy, especially for the larval stages, is extremely difficult to recognize. In addition to being inserted in different families and genera with major changes in the literature, they are also evidenced by old descriptions. Thus, the use of molecular techniques may be more efficient for diagnosis when compared to traditional taxonomic methods, especially for species with little intraspecific variation. In this sense, the objective of this study was to use the traditional taxonomy techniques and molecular biology in the identification of digenetic new species of the characiform fishes in three affluent of the Tietê River. As well as, evidencing, through phylogenetic analyses, new parasite-host relationships, the correct allocation of specimens within their respective families and new records of locality and hosts for the literature.

Keywords: Digenetic, 28S gene, ITS, freshwater fish, Neotropical region.

3. Introdução

INTRODUÇÃO

3.1 Rio Tietê e seus afluentes

O Brasil se destaca pela enorme descarga de água doce dos seus rios, apresentando aproximadamente 12% das águas disponíveis no planeta, distribuídos de forma irregular, variando devido aos processos climatológicos que regulam a disponibilidade de água (Agência Nacional de Águas, 2002). Desta forma, o país apresenta um conjunto importante de ecossistemas aquáticos representados por lagos, rios, represas e áreas alagadas com morfologias e morfometrias variadas e valores econômicos, sociais e ecológicos distintos (Tundisi, 2014).

O rio Tietê é um importante curso d'água do Estado de São Paulo, não somente por cortar toda a capital, mas também por atravessar praticamente todo o território paulista. Ele nasce no município de Salesópolis na Serra do Mar e atravessa toda região metropolitana, percorrendo cerca de 1.150 km até encontrar o rio Paraná, fazendo a composição de várias bacias (Ponçano *et al.*, 1981). Dentre estas bacias, encontramos a Bacia Hidrográfica do Tietê-Batalha.

O rio Batalha percorre 167 km e é considerado um dos mais importantes afluentes do rio Tietê. Sua nascente está na cidade de Agudos na Serra da Jacutinga (22°28'59"S 49°03'58"W) e sua Bacia Hidrográfica integra 11 cidades (Agudos, Piratininga, Bauru, Avaí, Duartina, Reginópolis, Presidente Alves, Uru, Pongai, Balbinos e Pirajuí) (Silva *et al.*, 2009).

Segundo a classificação da CETESB, a água do rio Batalha é considerada de boa qualidade, além disso, este rio é responsável por abastecer 45% da população bauruense (CETESB, 2017). Contudo, está ocorrendo um intenso processo de poluição

no rio pela presença de grandes indústrias que o margeiam na maioria das cidades. Estas indústrias tratam apenas uma porcentagem do esgoto e despejam o resto “*in natura*” no rio (Silva *et al.*, 2009). Além disso, a má ocupação e utilização do solo, devido a atividades antrópicas, como agricultura e pecuária contribuem para a redução da mata ripícola e nativa. Com isso, diversos processos prejudiciais ao rio são desencadeados, como a alteração da qualidade e poluição de suas águas e a exposição das áreas das nascentes, que resulta em processos de erosão de áreas adjacentes, contribuindo para o assoreamento do rio (Silva *et al.*, 2009). À vista disso, foram criadas as Áreas de Preservação Ambiental (APA's), unidades de conservação integradas, procurando harmonizar a conservação, recuperação ambiental e as necessidades humanas. Para o rio Batalha, a APA foi criada dia 01 de março de 2001 pela Lei nº 10.773 e abrange 11 municípios.

Outro rio que também se encontra na APA e faz parte da bacia do rio Tietê é o rio Jacaré-Pepira (21°53'30.5''S 48°48'33.0''W). Ele nasce na Serra de Itaqueri, localizado nas *cuestas* de São Pedro e Analândia no interior do Estado de São Paulo. Este rio, onde as matas ciliares se mantem presentes, é considerado um dos poucos do estado livres de poluição e que ainda possuem uma reserva de biodiversidade. Porém, atualmente, a bacia do rio Jacaré-Pepira está sofrendo com atividades antrópicas em seus cursos d'água (Gomiero, 2004). Como consequência dessa degradação ambiental, resultante do uso descontrolado de fertilizantes e pesticidas, desmatamento, introdução de espécies não nativas e construção de barragens, o rio vem sofrendo, cada dia mais, com a redução de sua diversidade de organismos, principalmente nas populações de peixes (Lowe-McConnell, 1990; Tundisi *et al.*, 2008).

O rio Jacaré-Guaçu (21°49'05.3''S 48°54'23.7''W), diferentemente do rio Jacaré-Pepira, se encontra em estado degradado. Suas águas fluem para o reservatório da cidade

de Ibitinga (rio Tietê) e a cabeceira é localizada na Serra de Itaqueri (município de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil). Este rio é um dos principais afluentes da margem direita do rio Tietê e um dos maiores afluentes da Bacia do Alto Paraná. O rio Jacaré-Guaçu sofreu grandes impactos pelas ações antrópicas devido ao desenvolvimento industrial. A migração do homem do campo para os centros urbanos ocasionou diversos processos que auxiliaram na má qualidade das águas, como despejo de esgotos domésticos juntamente com a ação da agropecuária e uso de pesticidas (Tundisi *et al.*, 2008). Isto ocorre devido ao rio abranger importantes centros urbanos como os municípios de Analândia, Brotas, Ibaté, Itirapina e São Carlos que desenvolvem diversificadas atividades na área da agropecuária e na área industrial (Lupa, 2008). Quando comparado com o rio Jacaré-Pepira, o rio Jacaré-Guaçu é considerado mais impactado e mais densamente ocupado (Fernández-Sánchez & Novelli, 1996). Como sistema aquífero, esses rios formam duas bacias contíguas sendo tributários do rio Tietê na região central do estado de São Paulo e apresentam elevada extensão, apresentando importância socioeconômica e ambiental (Corrêa, 1995; DAEE, 2003).

3.2 Peixes Characiformes

Essencial para a cadeia alimentar e utilizados economicamente como produto alimentício, encontramos diversas espécies de peixes nesses rios. A ordem Characiformes inclui aproximadamente 478 gêneros e 3.912 espécies válidas (Eschmeyer, 2021) e seus membros vivem exclusivamente em habitats de água doce (Nelson, 2006). Os Characidae são a quarta família mais diversificada (Eschmeyer & Fricke, 2020) e sua distribuição estende-se desde a região da Patagônia na Argentina até a fronteira Estado Unidos - México (Mirande, 2010).

O gênero *Astyanax* (Baird e Girard, 1854) possui 261 espécies válidas descritas (Eschmeyer, 2020) e é popularmente conhecido como “lambari”. As espécies *Astyanax lacustris* Lucena e Soares, 2016 e *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) têm diferentes distribuições geográficas. De acordo com FishBase (<http://www.fishbase.org>), *A. fasciatus* é distribuída da Argentina ao México, embora Ornelas-García *et al.* (2008) argumente que a espécie não é encontrada no México; enquanto isso, *A. lacustris* é distribuída exclusivamente pela América do Sul, particularmente no leste do Brasil. Em relação ao hábito alimentar, ambas as espécies são preferencialmente onívoras, se alimentando de plantas aquáticas, sementes, restos de vegetais superiores ou até mesmo de insetos terrestres e peixes como alimentos secundários (Bennemann *et al.*, 2005).

Astyanax altiparanae Garutti & Britski, 2000 era considerada válida, mas Lucena & Soares (2016) redescobriram duas espécies nominais no Brasil: *A. lacustris* e *Astyanax abramis* (Jenyns, 1842). A redescoberta dessas duas espécies foi baseada em comparações do diâmetro orbital, do número de raios da nadadeira anal e através de dados morfométricos. Com isso, reconheceram as espécies *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894), *Astyanax asuncionensis* Géry, 1972, e *A. altiparanae* como novos sinônimos juniores de *A. lacustris*. Portanto, neste trabalho, os espécimes até então considerados *A. altiparanae*, foram considerados atualmente como *A. lacustris*.

3.3 Parasitos de peixes

Os peixes são considerados os vertebrados com maiores índices de infecção causados por parasitos e, devido à sua longa história evolutiva, são também os substratos vivos com maior tempo de exposição para a adaptação de organismos simbioses (Malta, 1984). Com isso, as características do ambiente aquático facilitam a propagação, reprodução e complementação do ciclo de vida destes parasitos, o que gera índices

elevados de infestação/infecção nos peixes (Malta, 1984). Esses hospedeiros são de extrema importância tanto economicamente, através do consumo de sua carne, quanto ecologicamente para a manutenção da cadeia alimentar. Porém, devido à ação antrópica, a biodiversidade dos ambientes marinhos e dulcícolas está sendo ameaçada.

O estudo das espécies de parasitos constitui uma parte fundamental na compreensão da biodiversidade global, assunto que vem recebendo bastante destaque atualmente (Pérez-Ponce de León *et al.*, 2015). Apesar disso, este é o grupo menos pesquisado neste sentido, apresentando um déficit nos estudos sobre sistemática e biodiversidade parasitária, com aproximadamente 25% das espécies de parasitos descritas no mundo (Brooks & Hoberg, 2001; Poulin & Morand, 2004; Dobson *et al.* 2008). Esta biodiversidade, conseqüentemente, pode ser abordada, não apenas como uma questão de inventário de espécies, mas também como o estudo das relações hospedeiro-parasito em função de variáveis ecológicas e filogenéticas, sugerindo novas linhas de pesquisa neste sentido (Poulin & Morand, 2004).

3.4 Digenéticos

Os estudos de digenéticos estão crescentes, sobretudo em peixes caracídeos como *A. fasciatus* e *A. lacustris* (Tabela 1). Porém o estudo da taxonomia para indivíduos da Subclasse Digenea Carus, 1983, principalmente para as fases larvais, é extremamente difícil. Os estudos taxonômicos com essa Subclasse além de serem marcados por descrições antigas, também apresentam grandes mudanças na literatura em relação a alocação de família e gênero (Bray *et al.*, 2008).

Devido a esses obstáculos, é muito importante o estudo dessa fauna parasitária de modo a promover maior conhecimento das características morfológicas e biológicas como também na correta identificação taxonômica, já que isto é essencial para obter

conclusões confiáveis a respeito da biologia, ecologia e patogenicidade de qualquer digenético. Sendo assim, a associação de metodologias tradicionais com novas tecnologias pode solucionar problemas evidentes nas espécies já descritas e de novas espécies (Smith *et al.* 2008).

A Classe Trematoda Rudolphi 1808 é subdividida em duas subclasses, Aspidogastrea Faust e Tang, 1936 e Digenea. Segundo Kohn *et al.*, (2007), a América do Sul é a maior região de registros de digenéticos de peixes e desde então o número de descrições e registros vem crescendo. Estes são endoparasitos que podem ser encontrados em todos os tecidos e órgãos, parasitando todas as classes de vertebrados (Thatcher, 1981). Possuem o ciclo de vida complexo (heteróximo) onde dois ou mais hospedeiros são envolvidos, sendo que no primeiro hospedeiro, conhecido como hospedeiro intermediário, geralmente encontramos a fase larval do parasito (metacercária), majoritariamente representado por um peixe e a outra fase larval (cercaria) em gastrópodes. Já a fase adulta do parasito, os hospedeiros definitivos, geralmente são representados por peixes, aves e mamíferos (Niewiadomska, 2002). Sendo que os adultos produzem ovos que são liberados pelas fezes de seu hospedeiro definitivo, os ovos são eclodidos no ambiente liberando uma fase larval de vida livre (miracídeo). Esse miracídeo infecta geralmente gastrópodes onde vão se desenvolver até chegarem a fase de metacercária e as larvas sexuadas cercarias que podem penetrar ativamente ou ser ingeridas pelos hospedeiros definitivos (Kudlai *et al.*, 2018).

Patogenicidade

Em relação ao nível de patogenicidade, os trematódeos podem ser encontrados em qualquer tecido ou órgão. Com isso, alguns gêneros podem causar problemas para pisciculturas, dificultando a venda do pescado ou propriamente pela morte do peixe,

acarretando em perdas econômicas para o piscicultor (Thatcher, 1981). Causadas por metacercárias do gênero *Clinostomum* Leidy, 1856, a doença da mancha amarela, pode acometer as brânquias, pele, nadadeiras e gônadas dos peixes, podendo comprometer sua capacidade reprodutora (Thacher, 1981). Também acometida por diversas espécies de metacercárias, a doença da mancha preta pode ser identificada pela presença de cistos nas nadadeiras dos peixes e o nome da doença se dá, pois, esses cistos induzem a produção de pigmentação por parte dos peixes, deixando assim “manchas pretas” em seu corpo (Thatcher, 1981). Por fim, podemos evidenciar a doença dos olhos, causada pela presença de metacercárias geralmente do gênero *Diplostomum* Nordmann, 1832 nos olhos dos peixes. Estas metacercárias visam a cegueira destes para que possam ser facilmente predados e com isso, o parasito consiga completar o seu ciclo de vida (Thatcher, 1981).

Já em humanos, as zoonoses causadas por trematódeos têm grande destaque na saúde pública, principalmente nos países asiáticos como China e Japão (Santos, 1995). Em altas infecções, as manifestações clínicas podem ser graves, como nos casos de laringofaringite causada pelo digenético *Clinostomum complanatum* (Rudolphi, 1814) Braum, 1899, que pode causar morte por asfixia (Eiras, 1994) e de *Alaria americana* Hall & Wigdor, 1918 causadora de uma morte no Canadá por asfixia e hemorragia pulmonar (Freeman *et al.*, 1976). No Brasil, encontramos registros dos digenéticos *Diplostomum* sp. parasitando os olhos de seres humanos (Travassos *et al.*, 1969) e de *Phagicola longus* (Ransom, 1920) parasitando o intestino de uma mulher na região de Cananéia- SP (Chieffi *et al.*, 1990; Dias & Woiciechowski, 1994).

Famílias dos digenéticos

Como importantes componentes da fauna parasitária do sistema digestivo de peixes teleósteos e de alguns vertebrados como salamandras, serpentes e anuros,

evidenciamos os digenéticos da família Allocreadiidae (Loss, 1902) (Caira & Bogéa, 2005). Estes digenéticos são relativamente pequenos e quando adultos apresentam alguns caracteres morfológicos como tegumento liso, ovos relativamente grandes, testículos em posição tandem, saco do cirro bem desenvolvido, entre outras características. O ciclo de vida envolve hospedeiros intermediários e definitivos comumente encontrados em ambientes de água doce, como insetos aquáticos, crustáceos e peixes, respectivamente (Caira & Bogéa, 2005). Em relação a sistemática dentro do grupo dos trematódeos, várias famílias sofreram diversas modificações ao longo do tempo (Pérez-Ponce de León *et al.*, 2015). Devido à similaridade morfológica dos adultos dos membros da família Allocreadiidae, Lepocreadiidae e Opecoeliidae, a correta identificação morfológica se torna dificultada, com isso, esses parasitos foram inseridos em diversas famílias e diferentes gêneros ao decorrer da história (Caira & Bogéa, 2005).

Outro grupo que também enfrentou diversas alocações sistemáticas foram os membros da família Macroderoididae McMullen, 1937. A identificação errônea, muitas vezes, acompanhada pela escolha de caracteres morfológicos que são muito semelhantes em diversas famílias, como também pela falta de informação do ciclo de vida, acarretaram na dificuldade da correta classificação taxonômica desse grupo de digenéticos (Font & Lotz, 2008). Em relação a esses caracteres morfológicos, geralmente apresentam tegumento espinhoso, são alongados, com cecos cegos e sistema excretor cicloide (Caira & Bogéa, 2005). Também, quando adultos, são majoritariamente encontrados no intestino de peixes de água doce e suas fases larvais já foram descritas em peixes marinhos, crustáceos e até mesmo em sanguessugas (Font & Lotz, 2008). Segundo Font & Lotz, (2008), a família Macroderoididae possuíam pelo menos nove gêneros com problemas em sua identificação taxonômica, entre eles, o gênero *Magnivitellinum* Kloss, 1966. Através de estudos filogenéticos, esse gênero foi realocado para uma nova família

descrita, família Alloglossidiidae Hernández-Mena & Pérez-Ponce de León, 2016 (Hernández-Mena *et al.*, 2016).

3.5 Biologia Molecular

Desta maneira, sugerindo-se novas linhas de pesquisa, o uso da biologia molecular está crescente como nova ferramenta, tanto nos estudos de caracterização taxonômica para diagnósticos de gênero, realocação de gêneros e confirmação de espécies, quanto para estudos da relação evolutiva e populacionais entre grupos de parasitos através de hipóteses filogenéticas (Pérez-Ponce de León *et al.*, 2016). Segundo Buso (2005), o uso das técnicas moleculares pode ser mais eficiente para diagnose quando comparadas as tradicionais metodologias taxonômicas, principalmente para espécies com pouca variação intra-específica. Adicionalmente, investigações moleculares se mostraram indispensáveis para o estabelecimento das relações no campo da sistemática e filogenética para todos os níveis taxonômicos (Hillis & Moritz, 1990).

Ao longo da história da sistemática e filogenética, os genes nucleares e mitocondriais foram inseridos nos estudos de diversos animais, incluindo os parasitos. Entre o grupo de parasitos, em comparação ao marcador ITS 1-2 e os genes mitocondriais, o gene ribossomal 28S é considerado mais conservado e com pouca variação intra-específica (Blair, 2006). Dessa forma, ele é amplamente utilizado nos estudos de digenéticos para inferir grupos com parentesco próximo e distante em árvores filogenéticas a nível de gênero e família, sendo um gene eficiente para este tipo de análise (Blair, 2006) e contribuindo de maneira efetiva para elucidar a problemática encontrada sobre a diversidade de parasitos de peixes encontrada atualmente (Petkeviciute *et al.*, 2010; Blasco-Costa *et al.*, 2016).

Os espaçadores transcritos internos (ITS 1 e ITS 2), por possuírem regiões altamente variáveis, demonstraram serem marcadores efetivos para delimitação de espécies e até mesmo para o reconhecimento de espécies morfológicamente idênticas (espécies crípticas) em estudos com helmintos (Van Herwerden *et al.*, 1998; Blair, 2006). Comparando-se o ITS 1 e o ITS2, este último, devido ao seu curto comprimento e alta variabilidade, se mostrou mais eficiente para uma rápida diferenciação entre digenéticos com posições sistemáticas incertas (Curran, 2006). Deste modo, para estudos com trematódeos, o gene ribossomal 28S e o marcador ITS-2 são amplamente utilizados atualmente para elucidar problemas de delimitação de espécies e filogenia (Razo-Mendivil *et al.*, 2014; Pérez-Ponce de León *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2018; Hernández-Mena *et al.*, 2018).

10. *Considerações*

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos advindos desta tese nos permitiram descrever duas novas espécies de digenéticos, novos registros de hospedeiros para *Astyanax fasciatus* e *Astyanax lacustris* e novos registros de localidade provenientes de dois afluentes do rio Tiête: rio Batalha e rio Jacaré-Pepira.

Os espécimes de peixes coletados no rio Batalha, *A. fasciatus* e *A. lacustris* estavam parasitados em seus intestinos com *Wallinia brasiliensis* e *Creptotrematina batalhensis*. Estas foram novas espécies de digenéticos descritas através de taxonomia integrativa, sendo que ambas espécies foram a quarta descritas para o gênero e *W. brasiliensis* foi primeira espécie do gênero registrada no Brasil.

Em relação a *Magnivitellinum saltaensis*, utilizando o gene ribossomal 28S e o espaçador interno ITS, foi possível a identificação da espécie aqui estudada como sendo a mesma espécie descrita na Argentina. Também podemos evidenciar o primeiro registro desse digenético parasitando o intestino de *A. lacustris* e um novo registro de localidade: rio Jacaré-Pepira, no Município de Ibitinga, Estado de São Paulo, Brasil.

Através das análises filogenéticas do gene 28S e o ITS, podemos corroborar as características mais conservadoras para o gene 28S e mais variáveis para o espaçador interno ITS, demonstrando serem bons marcadores genéticos para as famílias Allocreadiidae e Aloglossidiidae.

No rio Jacaré-Guaçu em todos os espécimes coletados de *A. fasciatus* e *A. lacustris* não foram encontrados parasitos trematódeos.

Com isso, este estudo contribuiu agregando novos conhecimentos para o banco de dados moleculares os quais carecem de informações nessa área, principalmente para

algumas famílias de trematódeos e para alguns marcadores genéticos. Além disso, contribuímos para ampliar o conhecimento da biodiversidade de espécies de digenéticos encontradas infectando peixes de importância comercial oriundos de ambiente natural.