



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**"METAZOÁRIOS PARASITOS DE *SYNBRANCHUS MARMORATUS* (ACNOPTERYGII,
SYNBRANCHIFORMES, SYNBRANQUIDAE) CAPTURADOS NO PANTANAL DE MATO
GROSSO DO SUL MS, BRASIL"**

Leonardo França do Nascimento

Dissertação apresentada à
Fundação Universidade Federal de
Mato Grosso do Sul, como requisito
à obtenção do título de Mestre em
Biologia Animal.
Área de concentração: Zoologia.

Orientador: Fernando Paiva

Campo Grande, MS
Dezembro, 2023



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**"METAZOÁRIOS PARASITOS DE *SYNBRANCHUS MARMORATUS* (ACNOPTERYGII,
SYNBRANCHIFORMES, SYNBRANQUIDAE) CAPTURADOS NO PANTANAL DE MATO
GROSSO DO SUL, MS, BRASIL"**

Leonardo França do Nascimento

Dissertação apresentada à
Fundação Universidade Federal de
Mato Grosso do Sul, como requisito
à obtenção do título de Mestre em
Biologia Animal.
Área de concentração: Zoologia.

Orientador: Fernando Paiva

Campo Grande, MS
Dezembro, 2023



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



ATA DA CENTÉSIMA VIGÉSIMA SÉTIMA SESSÃO DE SEMINÁRIO PÚBLICO DE DISSERTAÇÃO PARA CONCLUSÃO DO CURSO DE Mestrado em Biologia Animal, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ZOOLOGIA, DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL.

Ata da sessão de seminário público de dissertação para conclusão do curso de mestrado apresentado pelo aluno LEONARDO FRANÇA DO NASCIMENTO para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal. Aos vinte e quatro dias do mês de janeiro do ano de dois mil e vinte e quatro, o aluno realizou a apresentação do seu Seminário de Conclusão de Curso, no Auditório do Instituto de Biociências. O aluno teve como orientador o Doutor FERNANDO PAIVA e como coorientador o Doutor LUIZ EDUARDO ROLAND TAVARES. A dissertação foi apresentada com o título: **"Metazoários parasitos de *Synbranchus marmoratus* (*Acnopterygi*, *Synbranchiformes*, *Synbranchidae*) capturados no Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil"**, tendo sido avaliada pelos membros da banca examinadora composta pelos Doutores: FELIPE BISAGGIO PEREIRA, da Universidade Federal de Minas Gerais; PRISCILLA SOARES DOS SANTOS, da Universidade Católica Dom Bosco e ISABELA CAROLINE OLIVEIRA DA SILVA, da Universidade Estadual de Minas Gerais. A sessão teve início às quatorze horas, quando o Presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos. A seguir, concedeu a palavra ao aluno, que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, o Presidente da Banca Examinadora fez suas considerações referentes ao trabalho desenvolvido pelo aluno e os pareceres emitidos pelos avaliadores. Concluídas as considerações, LEONARDO FRANÇA DO NASCIMENTO foi declarado Mestre em Biologia Animal. O autor foi informado que terá o prazo até trinta dias para apresentar a versão final da dissertação em meio digital, incluindo as correções propostas anteriormente pela banca examinadora e o Relatório Final à Secretaria do Curso. Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada.

Campo Grande, 24 de janeiro de 2024.

Assinaturas:

FERNANDO PAIVA (Presidente da banca)

LEONARDO FRANÇA DO NASCIMENTO (Aluno)

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Paiva, Professor do Magisterio Superior**, em 24/01/2024, às 14:40, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Resumo Geral

O peixe *Synbranchus marmoratus*, conhecido como mussum, pertencente à família Synbranchidae e a ordem Synbranchiformes. Apesar de não ser uma espécie de grande interesse comercial, estudos desta natureza são importantes para auxiliar na compreensão das relações entre metazoários parasitos e seus hospedeiros. Foram identificados através estudos morfológicos cinco grandes grupos de metazoários: Pentastomida (*Sebekia* sp.), Nematoda (*Brevimulticaecum* sp., *Eustrongylides* sp., Camallanidae e Capilaridae), Cestoda (Proteocephalidae), Trematoda (morfotipo *Neascus* e *Clinostomum* sp.) e Myxozoa (*Myxobolus* sp.). O Pentastomida *Sebekia* sp. foi o mais prevalente (35%), tendo sido encontrado em 14 hospedeiros com abundancia média de $0,90 \pm 3,34$. *Neascus* sp. com maior abundância encontrada parasitando 5% dos hospedeiros. Os nematodas apresentaram a maior riqueza de morfotipos com quatro grupos reportados, sendo eles *Brevimulticaecum* sp., larvas de *Eustrongylides* sp., adultos de Camallanidae gen. sp. e Capillaridae gen. sp. Adicionalmente, foram realizadas análises moleculares das larvas de *Eustrongylides* sp., e de espécimes da família Camallanidae. As larvas de *Eustrongylides* sp. morfológicamente se assemelham às larvas de *E. tubifex* pela presença de papilas com ápice espiniforme no círculo interno. Contudo, as sequências foram comparadas aquelas de *E. ignotus* e *E. excisus*, e a sequência obtida nesse estudo ficou mais próxima de outras espécies ainda não determinadas do gênero *Eustrongylides*. Para os espécimes de Camallanidae apesar da análise filogenética não ter agrupado a sequência obtida nesse estudo com outros três gêneros da família, a análise morfológica nos mostrou que a presente espécie está inserida na família Camallanidae, reforçando a necessidade de coletar novas amostras para podermos descrever uma nova espécie na família. Os estudos apresentados nessa dissertação ressaltam a necessidade de que mais dados sobre os metazoários parasitos de *S. marmoratus* sejam obtidos, já que a literatura com foco nesses hospedeiros é escassa. E devido o seu valor comercial na pesca esportiva esse conhecimento pode ser de grande valor para um maior entendimento da riqueza de metazoários parasitos de peixes de água doce.

Abstract

The fish *Synbranchus marmoratus*, known as "mussum," belongs to the family Synbranchidae and the order Synbranchiformes. Despite not being a species of great commercial interest, studies of this nature are important to assist in understanding the relationships between metazoan parasites and their hosts. Through morphological studies, five major groups of metazoans were identified: Pentastomida (*Sebekia* sp.), Nematoda (*Brevimulticaecum* sp., *Eustrongylides* sp., Camallanidae, and Capillaridae), Cestoda (Proteocephalidae), Trematoda (morphotype *Neascus* and *Clinostomum* sp.), and Myxozoa (*Myxobolus* sp.). Pentastomida *Sebekia* sp. was the most prevalent (35%), found in 14 hosts with an average abundance of 0.90 ± 3.34 . *Neascus* sp. showed the highest abundance, parasitizing 5% of the hosts. Nematodes presented the highest morphotype richness with four reported groups: *Brevimulticaecum* sp., *Eustrongylides* sp. larvae, adults of Camallanidae gen. sp., and Capillaridae gen. sp. Additionally, molecular analyses were performed on *Eustrongylides* sp. larvae and specimens of the family Camallanidae. The morphological similarity of *Eustrongylides* sp. larvae to *E. tubifex* larvae was observed due to the presence of papillae with spiniform apices in the inner circle. However, sequences were compared to those of *E. ignotus* and *E. excisus*, and the sequence obtained in this study was closer to other undetermined species of the genus *Eustrongylides*. For Camallanidae specimens, despite phylogenetic analysis not grouping the obtained sequence with three other genera in the family, morphological analysis indicated that the present species is within the Camallanidae family, emphasizing the need to collect new samples to describe a new species in the family. The studies presented in this dissertation highlight the need for more data on the metazoan parasites of *S. marmoratus* since literature focusing on these hosts is scarce. Due to its commercial value in sport fishing, this knowledge can be of great value for a better understanding of the richness of metazoan parasites in freshwater fish.

Introdução Geral

1. O hospedeiro *Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795

A ordem Synbranchiformes Berg, 1940 é composta por três famílias, 15 gêneros e, aproximadamente 90 espécies, quase todas de água doce (NELSON, 2006; BRITSKI et al., 2007). Os Synbranchiformes, de modo geral, caracterizam-se por apresentarem corpo alongado, ausência de nadadeiras pélvicas, abertura branquial confinada à metade inferior do corpo e pré-maxila não-protrusível (JOHNSON; PATTERSON, 1993).

Na família Synbranchidae estão inseridos os peixes conhecidos popularmente como mussuns ou “*swamp eels*”, apresentam distribuição geográfica nas regiões tropicais e sub-tropicais, habitam água doce, sendo que algumas espécies ocorrem em águas salobras (raramente marinhos). Ocorrem na África Ocidental, Libéria, Ásia, arquipélago Indo-Australiano, América Central, América do Sul e América do Norte (MONTENEGRO, 2009). A família é composta por quatro gêneros, *Macrotrema* (com uma espécie única que ocorre em água doce e salobra, distribuída na Tailândia e península Malaia), *Ophisternon* (com seis espécies descritas, sendo duas no continente americano e quatro na Eurásia), *Synbranchus* (com 4 espécies que ocorrem México, América Central e do Sul) e *Monopterus* (com oito espécies que ocorrem na Libéria e na região do Paquistão ao Japão) (NELSON, 2006; SABAJ et al. 2022).

No Brasil a espécie *Synbranchus marmoratus* é comum em ambientes lânticos e toleram baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água (condição de anóxia). Apesar de ocorrerem principalmente em brejos e regiões pantanosas, estes peixes também podem ser encontrados em tocas ou em meio à vegetação marginal em áreas lânticas de riachos (BUCKUP, 1999). Durante sua etapa de vida juvenil, alimenta-se de zooplâncton, pequenos crustáceos e insetos associados à vegetação flutuante. Na etapa adulta, passa a ingerir peixes e moluscos (MONTENEGRO, 2009).

Em estudos arqueológicos na região amazônica, pesquisadores concluíram que a espécie *S. marmoratus* era utilizada por civilizações humanas naquela região entre os períodos de 500 A.C e 1400 D.C, porque era uma espécie que podia ser

encontrada durante o ano todo em vários tipos de corpos de água doce (GABRIELA et al. 2021).

Apesar da espécie *S. marmoratus*, atualmente não ser muito utilizada para consumo, ela possui valor na piscicultura, pois é comercializada para ser utilizada como isca viva em centros pesqueiros.

2. Parasitos de *Synbranchus marmoratus*

O parasitismo por diferentes espécies, principalmente aquelas que causam lesões ou até mesmo elevadas taxas de mortalidade em seus hospedeiros, tem sido objeto de estudo principalmente em peixes de interesse econômico (LOM & DYKOVÁ, 1992; RODRIGUES et al., 2018). Sabe-se que entre os processos que podem ser responsáveis pela distribuição espacial dos parasitos, estão os constantes cenários de mudanças no ambiente e invasões biológicas (HARVELL et al., 2009; ALTIZER et al., 2013; TAVARES-DIAS & OLIVEIRA, 2017). Estudos sobre a caracterização de espécies e das comunidades parasitárias de peixes podem oferecer informações importantes tanto sobre seus hospedeiros, quanto sobre o ambiente de maneira geral, uma vez que as alterações ambientais, podem ser determinantes para a ocorrência ou não de determinadas espécies de parasitos (CINTRA et al., 2013).

Para os parasitos de *S. marmoratus* são conhecidos registros de espécies de protozoários e metazoários. Com relação aos protozoários, Lainson (1981) registrou a ocorrência de *Cyrtia gomesi* e *Trypanosoma bourouli* em espécimes de *S. marmoratus* no Pará. Neste estudo, o autor comprovou a transmissão dessas duas espécies de protozoários pela sanguessuga *Haementeria lutzi*. Diniz et al. (2002) e registrou detalhes da ultraestrutura de trofozoítos de *Cyrtia lignieresii* também acometendo *S. marmoratus* no estado do Pará. Posteriormente, Eiras et al. (2012) apresentaram uma lista de espécies de protozoários parasitos de peixes no Brasil e citaram os registros de *C. lignieresii* e *T. borouli* realizados anteriormente no Pará.

Com relação aos metazoários parasitos, Hernández et al. (2003) registraram a ocorrência de metacercárias de *Centrocestus formosanus* nas brânquias de *S. marmoratus* em Sucre, na Venezuela. Takemoto et al. (2009) citaram a ocorrência de uma espécie não identificada de Digenea parasitando *S. marmoratus* na planície de inundação do alto rio Paraná. Acosta et al. (2016) registraram a ocorrência de metacercárias da espécie *Clinostomum detruncatum* acometendo *S. marmoratus* no

rio Paraná no estado do Paraná. Já em 2019, Fernandez et al. (2019) propuseram um novo gênero de trematoda, *Parvaprostatum*, com a espécie *P. synbranchi* parasito de *Synbranchus marmoratus* no Uruguai. Lehun et al. (2020) apresentaram uma atualização sobre os parasitos de peixes encontrados na planície de inundação do alto rio Paraná e registraram a ocorrência de Digenea fam. gen. sp. acometendo *S. marmoratus*. Em 2017, Arredondo et al. (2017) propuseram um novo gênero de Cestoda em *S. marmoratus* no rio Colastiné, na Argentina, com a nova espécie *Synbranchiella mabelae*. Mixosporídeos também são encontrados parasitando *S. marmoratus* Mathews et al. (2022) encontraram esporos de uma nova espécie do gênero *Myxobolus* sp., parasitando a mandíbula de um espécime de *S. marmoratus* coletado na região do Pantanal, Brasil. Recentemente Mathews et al. (2023) registraram pela primeira vez outro mixosporídeos do gênero *Henneguya* em *S. marmoratus* na Amazônia peruana. Esse é o primeiro desse parasito em peixes Potamódramos (peixes que migram entre massas de água doce) na América do Sul.

Luque et al. (2011), em uma lista de espécies de nematodas parasitos de peixes no Brasil, citaram a ocorrência de uma espécie não identificada de nematoda, *Eustrongylides ignotus* e *Eustrongylides* sp. parasitando *S. marmoratus*.

Com relação a Pentastomida, Brito et al. (2012) citaram a ocorrência de *Sebekia oxicephala* parasitando *S. marmoratus*, entretanto, neste trabalho não há citação da localidade em que tal ocorrência foi observada. Posteriormente, Luque et al. (2013) registraram a ocorrência de *S. oxicephala* no intestino de *S. marmoratus*.

Os poucos registros de espécies de agentes parasitários acometendo *S. marmoratus* no Brasil, incentivaram o desenvolvimento do presente estudo, que teve como objetivos identificar através de características morfológicas e moleculares os metazoários recuperados em *S. marmoratus* adquiridos em um comércio de iscas vivas no Município de Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul Brasil, além de descrever suas infrapopulações e infra comunidades parasitárias.

Neste sentido, a presente dissertação será apresentada em dois capítulos, sendo o primeiro intitulado: Metazoários parasitos de *Synbranchus marmoratus* (Actinopterygii, Synbranchiformes, Synbranchidae), coletados no Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil, e o segundo capítulo intitulado: Caracterização Morfológica e Molecular de dois gêneros de Nematoda parasitos de *Synbranchus marmoratus* (Actinopterygii, Synbranchiformes, Synbranchidae), coletados no Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, A. A.; CAFFARA, M.; FIORAVANTI, M. L.; UTSUNOMIA, R.; ZAGO, A. C.; FRANCESCHINI, L.; DA SILVA, R. J. Morphological and molecular characterization of *Clinostomum detruncatum* (Trematoda: Clinostomidae) metacercariae infecting *Synbranchus marmoratus*. **The Journal of Parasitology**, 102(1), 151-156. 2016.

ADLARD; MILLER; SMIT. The butterfly effect: parasite diversity, environment, and emerging disease in aquatic wildlife. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 4, 2015.

ALTIZER, S.; OSTFELD, R. S.; JOHNSON, P. T.; KUTZ, S.; HARVELL, C. D. Climate change and infectious diseases: from evidence to a predictive framework. **Science**, 341(6145), 514-519. 2013.

ARREDONDO, N. J.; VIEIRA ALVES, P.; GIL DE PERTIERRA, A. A. A new genus of proteocephalid tapeworm (Cestoda) from the marbled swamp eel *Synbranchus marmoratus* Bloch (Synbranchiformes: Synbranchidae) in the River Paraná basin, Argentina. **Folia Parasitologica** 64(015): 1-12. 2017.

BRITSKI, Heraldo A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, BALZAK S. **Peixes do Pantanal - Manual de identificação**. 2007.

BRITO, S. V.; ALMEIDA, W. O.; ANJOS, L. A.; SILVA, R. J. New host records of Brazilian pentastomid species. **Brazilian Journal of Biology**, 72, 393-396. 2012.

BUCKUP, P. A. Sistemática e biogeografia de peixes de riacho. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R. & PERES-NETO, P. R. (Eds.) **Ecologia de Peixes de Riachos**. Série Oecologia Brasiliensis, vo. VI. PPGE – UFRJ. Rio de Janeiro, Brasil. p. 91 – 138. 1999.

CINTRA, I. H. A.; ROCHA, J. C.; NAKAYAMA, L.; MARTINS, J. C.; SILVA, K. C. A pesca de *Hemiodus unimaculatus* (Bloch, 1794) na área de influência da usina hidrelétrica de Tucuruí, Pará, Brasil. **Acta pesca**, v. 1, n.1, p.1-12, 2013.

DINIZ, J.; SILVA, E.; DE SOUZA, W.; LAINSON, R. Some observations on the fine structure of trophozoites of the haemogregarine *Cyrtia lignieresii* (Adeleina: Haemogregarinidae) in erythrocytes of the fish *Synbranchus marmoratus* (Synbranchidae). **Parasitology research**, 88(7), 593-597. 2002.

EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C.; LUQUE, J. L. Checklist of protozoan parasites of fishes from Brazil. **Zootaxa**, 3221(1), 1-25. 2012.

FERNANDEZ, R. V.; TOURNE, M. L.; GUERRERO, D. C. *Parvaprostatum synbranchi* n. Gen. N. Sp. (Trematoda: Diplostomida), parásito de la anguila *Synbranchus marmoratus* Bloch, 1795 en Uruguay. **Neotropical Helminthology**, 13(2). 2019.

GABRIELA, P. C., TAKAYUKI, Y., JEAN-LOUIS, D., KÉLIG, M., PHILIPPE, B. Reconstructing freshwater fishing seasonality in a neotropical savanna: First application of swamp eel (*Synbranchus marmoratus*) sclerochronology to a pre-Columbian Amazonian site (Loma Salvatierra, Bolivia). **Journal of Archaeological Science: Reports**, 37, 102880. 2021.

HARVELL, D.; ALTIZER, S.; CATTADORI, I. M.; HARRINGTON, L.; WEIL, E. Climate change and wildlife diseases: when does the host matter the most? **Ecology**, 90(4), 912-920. 2009.

HERNÁNDEZ, L. E.; DÍAZ, M. T.; BASHIRULLAH, A. K. Descripción de diferentes estadios de desarrollo de *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Digenea: Heterophyidae). **Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias**, 13(4), 285-293. 2003.

JOHNSON, G. D., PATTERSON, C. Percomorph phylogeny: a survey of acanthomorphs and a new proposal. **Bulletin Ofmarine Science**, Miami, v. 52, n. 1, p.554-626. 1993.

LAINSON, R. On *Cyrtia gomesi* (Neiva and Pinto, 1926) gen.nov. (Haemogregarinidae) and *Trypanosoma bourouli* Neiva and Pinto, in the fish

Synbranchus marmoratus simultaneous transmission by the leech *Haementeria lutzii*. In: CanningEU (ed) **Parasitological topics**. (Society of Protozoologists special publication 1) Society of Protozoologists, London, pp 150–158. 1981.

LEHUN, A. L., HASUIKE, W. T., SILVA, J. O. S., CICCHETO, J. R. M., MICHELAN, G., RODRIGUES, A. D. F. C., NICOLA, D. N.; LIMA, L. D.; CORREIA, N. A.; TAKEMOTO, R. M. Checklist of parasites in fish from the upper Paraná River floodplain: An update. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 29. 2020.

LOM, J.; DYKOVÁ, I. Fine structure of Triactinomyxon early stages and sporogony: Myxosporean and Actinosporean features compared. **The Journal of Protozoology**. V (39): 16-27, 1992.

LUQUE, J. L.; AGUIAR, J. C.; VIEIRA, F. M.; GIBSON, D. I.; SANTOS, C. P. Checklist of Nematoda associated with the fishes of Brazil. **Zootaxa**, 3082(1), 1-88. 2011.

LUQUE, J. L.; PAVANELLI, G.; VIEIRA, F.; TAKEMOTO, R.; EIRAS, J. Checklist of Crustacea parasitizing fishes from Brazil. **Check List**, 9(6), 1449-1470. 2013.

MATHEWS, P. D., MERTINS, O., MILANIN, T., AGUIAR, J. C., GONZALES-FLORES, A. P., TAVARES, L. E., MORANDINI, A. C. Ultrastructure, surface topography, morphology and histological observations of a new parasitic cnidarian of the marbled swamp eel from the world's largest tropical wetland area, Pantanal, Brazil. **Tissue and Cell**, 79, 101909. 2022.

MATHEWS, P. D., MERTINS, O., ESPINOZA, L. L., AGUIAR, J. C., MILANIN, T. First report of a histozoic *Henneguya* (Cnidaria, Endocnidozoa) infecting a synbranchid potamodromous fish from South America: Morphostructural and biological data. **Zoosystematics and Evolution**, 99(2), 391-397. 2023.

MONTENEGRO, L. A. Biologia alimentar e morfohistologia do tubo digestório do mussum, *Synbranchus marmoratus*, Bloch (Osteichthyes: Synbranchidae) no açude Marechal Dutra “Gargalheiras”, localizado no semi-árido brasileiro. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, 2009.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Hoboken. 2006.

RODRIGUES, R. N.; OLIVEIRA, M. S. B.; TAVARES-DIAS, M.; & CORRÊA, L. L. First record of infection by *Trypanosoma* sp. of *Colossoma macropomum* (Serrasalminidae), a neotropical fish cultivated in the Brazilian Amazon. **Journal of Applied Aquaculture**, 30(1), 29-38. 2018.

SABAJ, M. H., ARCE, M., DONAHUE, D., CRAMER, A., SOUSA, L. M. *Synbranchus* of the Middle to Lower Xingu Basin, Brazil, with the description of a new rheophilic species, *S. royal* (Synbranchiformes: Synbranchidae). **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, 166(1), 1-23. 2022.

TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C.; LIZAMA, M. A. P.; LUQUE, J. L.; POULIN, R. Host density as a major determinant of endoparasite species richness in fishes of floodplain of the upper Parana River, Brazil. **Journal of Helminthology**, 79(1), 75-84. 2005.

TAKEMOTO, R. M., PAVANELLI, G. C., LIZAMA, M. D. L. A., LACERDA, A. C. F., YAMADA, F. H., MOREIRA, L. H. A., CESCHINI, T. L.; BELLAY, S. Diversity of parasites of fish from the Upper Paraná River floodplain, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 69(2), 691-705. 2009.

TAVARES-DIAS, M.; OLIVEIRA, M. S. B. Structure of parasites community in *Chaetobranchopsis orbicularis* (Cichlidae), a host from the Amazon River system in northern Brazil. **Parasitology Research**, 116(8), 2313-2319. 2017.

**CAPÍTULO I: METAZOÁRIOS PARASITOS DE *SYNBRANCHUS MARMORATUS*
(ACTINOPTERYGII, SYNBRANCHIFORMES, SYNBRANQUIDAE), COLETADOS NO PANTANAL DE
MATO GROSSO DO SUL, BRASIL**

**METAZOANS PARASITES OF *SYNBRANCHUS MARMORATUS* (ACTINOPTERYGII,
SYNBRANCHIFORMES, SYNBRANQUIDAE), COLLECTED IN THE MATO
GROSSO DO SUL PANTANAL, BRAZIL**

RESUMO

Este estudo teve por objetivo registrar a ocorrência de metazoários parasitos em *S. marmoratus*. Foram examinados 40 espécimes adquiridos em um comércio local de iscas vivas no município de Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Foi coletado um total de 94 espécimes de metazoários parasitos divididos em cinco taxa principais, Cestoda, Myxozoa, Nematoda, Pentastomida, e Termatoda. *Sebekia* sp. foi o taxa mais prevalente e *Neascus* sp. o mais abundante. *Sebekia* sp. e Proteocephalidae gen. sp. apresentaram correlação positiva e *Neascus* sp. correlação negativa com o comprimento dos hospedeiros. A abundância total média foi de $2,35 \pm 2,86$ e a riqueza parasitária média de $1,15 \pm 0,89$. A riqueza e abundância não apresentaram correlação com o comprimento dos hospedeiros. No geral, as infrapopulações parasitárias foram caracterizadas por espécies com baixa prevalência e abundância e as infracomunidades por uma baixa abundância total média e riqueza parasitária, demonstrando, conseqüentemente uma baixa diversidade parasitária.

ABSTRACT

This study aimed to record the occurrence of metazoan parasites in *S. marmoratus*. Forty specimens obtained from a local live bait shop in the municipality of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil, were examined. A total of 94 specimens of metazoan parasites were collected, classified into five main taxa: Cestoda, Myxozoa, Nematoda, Pentastomida, and Trematoda. *Sebekia* sp. was the most prevalent taxon, and *Neascus* sp. was the most abundant. *Sebekia* sp. and Proteocephalidae gen. sp. showed a positive correlation, while *Neascus* sp. showed a negative correlation with the length of the hosts. The mean total abundance was 2.35 ± 2.86 , and the mean parasitic richness was 1.15 ± 0.89 . Parasitic richness and abundance showed no correlation with the length of the hosts. Overall, the parasitic infrapopulations were characterized by species with low prevalence and abundance, and the infracommunities exhibited low mean total abundance and parasitic richness, indicating consequently low parasitic diversity.

INTRODUÇÃO

O mussum, *Sybranchus marmoratus* Bloch 1975, pertence à família Synbranchidae e a ordem Synbranchiformes. São peixes de corpo alongado, sem nadadeiras pélvicas e com abertura branquial localizada no lado inferior do corpo (BRITSKI et al., 2007; MONTENEGRO et al., 2011). Uma característica dominante dessa espécie é o hermafroditismo com inversão sexual, sendo considerado como uma capacidade especializada. *S. marmoratus* é um peixe hermafrodita protogínico diândrico, onde os indivíduos hermafroditas possuem gônadas que atuam como ovários e/ou como testículos. Nos indivíduos hermafroditas protogínicos, as gônadas funcionam no início como ovários e mais tarde há reversão sexual e as gônadas funcionam como testículos (LO NOSTRO, 2000; BARROS, 2012).

Os peixes de maneira geral são os vertebrados que apresentam os maiores índices de infecção por parasitos, devido a características próprias do meio aquático, que representa um ambiente favorável para o acesso e a penetração de patógenos, sobretudo em locais sujeitos às ações antrópicas (PAVANELLI et al., 2008).

Muitas vezes, um estudo relacionado aos parasitos de peixes, pode determinar a situação na qual se encontra um determinado ambiente aquático, desta maneira torna-se necessária análises de descritores parasitários, pois esses agentes podem provocar altas taxas de mortalidade nos hospedeiros (PAVANELLI et al., 2008).

Portanto, temos como objetivo desse estudo analisar os descritores parasitários tais como prevalência, riqueza, abundância média e intensidade média de infecção dos metazoários parasitos presentes em *S. marmoratus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridos um total de 40 espécimes de *S. marmoratus*, em um comércio local de Iscas-Vivas, que captura os exemplares em uma região do rio Miranda, Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil.

Os peixes foram transportados vivos para o Laboratório de Parasitologia Animal da UFMS, onde foram eutanasiados por transecção da coluna vertebral (os indivíduos não foram anestesiados por banho de imersão, para que não ocorresse alteração da fauna parasitária no epitélio branquial) (CONCEA, 2013). Em seguida foram pesados em balança eletrônica com aproximação de 0,01g, foram medidos com auxílio de fita métrica o comprimento total (cm), e os espécimes foram analisados para verificar a presença de cistos ou ectoparasitos pelo corpo. Durante a necropsia foram expostas as brânquias e as vísceras, com finalidade de detectar eventuais alterações nas características destes órgãos, e a presença de parasitos ou cistos (CARRIERO et al.; 2013). A cavidade do corpo foi aberta ventralmente e os órgãos internos foram colocados separadamente em placas de Petri contendo solução salina a 0,65%, sendo em seguida examinados para a detecção de endoparasitos. Os arcos branquiais foram individualizados, vísceras abdominais, estômago, ceco pilóricos e intestino foram abertos e seu conteúdo examinados em microscópio estereoscópico.

Os espécimes de Pentastomida, Nematoda, Trematoda, Cestoda encontrados vivos foram lavados com solução salina, fixados em solução quente de formaldeído a 4% aquecido e preservados em etanol a 70%, para análise morfológica. Alguns fragmentos de espécimes de Nematoda e Trematoda foram fixados em etanol de 99% P.A. para futuros estudos moleculares. Os pentastomídeos e os nematodas foram clarificados em série crescente de glicerina e os cestodas foram corados com carmim acético pelo método regressivo. Espécimes de nematodas e cestodas, preparados para microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram desidratados por uma série de etanol graduado, secos por evaporação com hexametildisilazano, metalizados com ouro e observadas em microscópio JEOL JSM 6460-LV, a uma tensão de aceleração de 15kV, ou no microscópio Hitachi TM3000 com aceleração de 5kV. Os cistos de Myxozoa foram comprimidos entre lâmina e lamínula para exposição dos esporos em meio Grey-Wess. A identificação dos pentastomídeos foi realizada de acordo com Thatcher (2006), dos nematodas

foi realizada conforme Moravec (1998) e Moravec et al. (1997); dos trematodas conforme Kanev et al. (2002) e Niewiadomska (2002); do cestodas conforme Khalil et al. (1994) e dos myxozoos conforme Lom e Dykova (1992).

Foram calculados os descritores quantitativos para as infrapopulações parasitárias (prevalência, intensidade média de infecção e abundância média de infecção) (BUSH et al. 1997), e a abundância total média e riqueza parasitária média para as infrapopulações parasitárias. O índice de dispersão (ID) e o índice de discrepância foram utilizados para verificar o padrão de distribuição das infrapopulações parasitárias (REICZIGEL et al., 2019).

Para verificar a possível associação entre o comprimento total e o peso dos hospedeiros foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Este coeficiente também foi utilizado para testar a possível associação entre o comprimento total dos hospedeiros com a abundância das espécies de parasitos, a abundância total e a riqueza parasitária (ZAR, 1999), com nível de significância de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Os 40 espécimes de *S. marmoratus* examinados pesaram entre 70 a 300 g, com média de $181,8 \pm 73,5$ g e mediram entre 26 a 65 cm de comprimento total, com média de $47,8 \pm 11,3$ cm. O comprimento total está correlacionado positivamente com o peso dos hospedeiros ($r_s = 0,840$; $P < 0,001$). No total foram coletados 94 espécimes de metazoários parasitos distribuídos em cinco taxa principais, como Pentastomida (Fig. 1), Trematoda (Fig. 2), Cestoda (Fig. 3), Nematoda (Fig. 4) e Myxozoa. E do total de indivíduos examinados, 29 (72,5%) estavam parasitados por pelo menos uma espécie de metazoário parasito.

Sebekia sp. foi o taxa mais prevalente e ocorreu em 14 hospedeiros, e *Neascus* sp. (Fig. 1) foi o taxa mais abundante, seguido por Pentastomida fam. gen. sp. e por *Clinostomum* sp. (Tab. 1). Os nematodas apresentaram a maior riqueza, representados pelas larvas de *Brevimulticaecum* sp., larvas de *Eustrongylides* sp., e adultos de Camallanidae gen. sp. e Capillaridae gen. sp. (Tabela 1). Os metazoários parasitos de *S. marmoratus* apresentaram padrão agregado de distribuição (Tab. 2). *Sebekia* sp. e Proteocephalidae gen. sp. apresentaram correlação positiva com o comprimento dos hospedeiros, enquanto *Neascus* sp. apresentou correlação negativa (Tab. 3).

A abundância total média foi de $2,35 \pm 2,86$ parasitos por hospedeiro e a riqueza parasitária média foi de $1,15 \pm 0,89$. A abundância total ($r_s = 0,144$; $P = 0,377$) e a riqueza

parasitária ($rs = 0,299$; $P = 0,061$) não apresentaram correlação com o comprimento dos hospedeiros.

DISCUSSÃO

De forma geral a comunidade de metazoários parasitos de *S. marmoratus* adquiridos em um estabelecimento comercial de iscas vivas no município de Campo Grande, MS, Brasil foram caracterizadas por predomínio de espécies de endoparasitos em estágio larval, com maior riqueza de nematodas, baixa prevalência e abundância de taxa de parasitos, e baixa abundância total média e riqueza parasitária média.

O predomínio de espécies de endoparasitos em estágio larval, e a ocorrência de espécies com baixa prevalência e baixa abundância, tem sido relatado em outras espécies de peixes capturados na região do Pantanal de Mato Grosso do Sul, como *Serrasalmus marginatus*, *Pygocentrus nattereri* e *Triportheus nematurus* (VICENTIN et al. 2011; VICENTIN 2013; COSTA-PEREIRA et al. 2014). Apesar destas espécies serem pertencente à ordem Characiformes, e da importância da filogenia dos hospedeiros na composição e estrutura das comunidades parasitárias de peixes de água doce (LOCKE et al. 2013), fatores locais, como as condições ambientais, podem ser determinantes para moldar essas comunidades parasitárias. As condições do ambiente podem influenciar diferentes aspectos da interação entre espécies, como a disponibilidade de formas infectantes em fase de vida livre, a disponibilidade de hospedeiros intermediários e paratênicos, a escassez de recursos alimentares e outras características que podem reduzir a resposta imune dos hospedeiros (JOHNSON et al. 2004).

Em um estudo com quatro espécies de peixes ornamentais do gênero *Corydoras* (Callichthyidae), Ferreira et al. (2019), destacam que esses apresentam uma alta taxa de infecção parasitária devido à alta densidade de indivíduos dentro de um mesmo recinto, isto facilitaria a transmissão de parasitos, inclusive em estágio larval, uma vez que várias espécies de parasitos podem utilizar peixes como hospedeiros secundários, intermediário ou hospedeiros paratênicos. Para os espécimes de *S. marmoratus* examinados nesse estudo, podemos sugerir a mesma lógica, uma vez que também é uma espécie de valor econômico e é comum que os viveiros em que esses peixes são mantidos também possuam uma alta densidade de indivíduos.

O tamanho dos hospedeiros é considerado um preditor da abundância e da riqueza de espécies de parasitos (POULIN, 1999; POULIN et al. 2011). Entretanto, no presente estudo poucos táxons apresentaram correlação positiva com o comprimento dos hospedeiros, fato já observado para outra espécie de peixe capturado no Pantanal de Mato Grosso do Sul (COSTA-

PEREIRA et al. 2014). Entretanto, no estudo de Costa-Pereira et al. (2014), a amplitude de tamanho dos hospedeiros foi muito pequena quando comparada com a do presente estudo, pois o comprimento total variou de 26 a 65 cm. Todavia, a escala do estudo desenvolvido pode influenciar na relação entre a abundância e o tamanho dos hospedeiros. Segundo Poulin (1999), quando muitos hospedeiros não parasitados são inseridos nas análises, as relações entre o comprimento e abundância tendem a não ser significativas.

Outro fator que pode ser considerado importante para a caracterização das comunidades parasitárias são as relações tróficas. Baia et al. (2018), apontam que a maioria das espécies trabalhadas durante seu estudo apresentaram fauna pararasitária parecida, exceto para peixes piscívoros e detritívoros que abrigaram faunas parasitárias mais ricas do que os peixes carnívoros e onívoros. Para *S. marmoratus* encontramos uma lógica parecida, como é uma espécie em que quando está em sua fase adulta ela passa a se alimentar de quase exclusivamente de fauna associada aos ambientes aquático como insetos e crustáceos isso poderia explicar a baixa diversidade parasitária encontrada nesse estudo.

Para a família Synbranchidae, Moravec et al. (2019), descreveu uma nova espécie de nematoda *Heliconema monopteri* n. sp. (Physalopteridae). Esse parasito foi descrito no estomago e no intestino de *Monopterusuchia*, uma espécie de água doce encontrada na Índia. Sendo o primeiro registro para esse gênero de nematoda para a Ordem Synbranchiformes.

O espécime pertencente à família Protocephalidae, difere da espécie *Synbranchiella mabelae*, descrita em *S. marmoratus* na Argentina por Arredondo et al. (2017). *Synbranchiella mabelae* apresenta as ventosas biloculadas separadas por um septo robusto e com os lóculos de tamanho desigual. No material coletado no presente estudo foi possível observar a ocorrência de ventosas biloculadas, porém, sem apresentarem septo separando os lóculos. Adicionalmente, estudos futuros de caracterização genotípica serão fundamentais para a determinação específica.

Pelo exposto, é justificável mais estudos com esta mesma espécie de hospedeiro, visando coletar mais espécimes para que seja possível a determinação dos taxa de parasitos que não tiveram sua identificação a nível específico. Já que Algumas espécies de parasitos encontrada durante a realização desse estudo constituem novos registros sendo elas *Brevimulticaecum* sp., Camallanidae gen. sp. Capillaridae gen. sp., (Nematoda) *Neascus* sp. (Trematoda).

REFERÊNCIAS

BAIA R. R. J, FLORENTINO, A. C., SILVA, L. M. A., TAVARES-DIAS, M. Patterns of the parasite communities in a fish assemblage of a river in the Brazilian Amazon region. *Acta parasitologica* 2018; 63(2), 304-316.

BARROS, NHC. *Ecologia reprodutiva do mussum, Synbranchus marmoratus, Bloch, 1795 (Osteichthyes: Synbranchidae) no açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte*. [Dissertação]. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. p. 97, 2012.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, BALZAK S. *Peixes do Pantanal - Manual de identificação*. 2007.

CARRIERO M. M., ADRIANO E. A, SILVA M. R. M., CECCARELLI P. S., MAIA A. A. M. Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with Several New South American Species. *PLos One* 2013. V.8(9): 1-12.

COSTA-PEREIRA R., PAIVA F., TAVARES L. E. R. Variation in the parasite community of the sardine fish (Actinopterygii: Characidae) from the Medalha lagoon in the Pantanal wetland, Brazil. *Triportheus nematurus*. *Journal of Helminthology* 2014. 88(3): 272-277.

FERREIRA M. M., PASSADOR R. J., TAVARES-DIAS M. Community ecology of parasites in four species of Corydoras (Callichthyidae), ornamental fish endemic to the eastern Amazon (Brazil). *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2019. 91.

JOHNSON M. W., NELSON P. A., DICK T. A. Structuring mechanisms of yellow perch (*Perca flavescens*) parasite communities: host age, diet, and local factors. *Canadian Journal of Zoology* 2004. 82(8), 1291-1301.

KANEV, I.; RADEV, V.; FRIED, B. Family Clinostomidae Lühe, 1901. In: *Keys to the Trematoda: Volume I*. Wallingford UK: CABI Publishing, p. 113-120. 2002.

KANEV I., RADEV V., FRIED B. Family Clinostomidae Lühe, 1901. In: GIBSON DI, JONES AE, BRAY RA. (Ed). *Keys to the Trematoda*. Volume 1. London: CABI Publishing and the Natural History Museum 2002. p. 113-120.

KHALIL L. F., JONES A., BRAY, R. A. *Keys to the cestode parasites of vertebrates*. St Albans, CAB International, 751 p. 1994.

LO NOSTRO F. L. *Espermatogénesis, ciclo anual e inducción hormonal de la espermiación en el pez protoginico diandrico, Synbranchus marmoratus, Bloch, 1795 (Teleostei, Synbranchidae)*. [Tese de Doutorado]. Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Exatas, Hemeroteca, Universidade de Buenos Aires, Argentina. p. 170. 2000.

LOCKE S. A., MCLAUGHLIN J. D., MARCOGLIESE D. J. Predicting the similarity of parasite communities in freshwater fishes using the phylogeny, ecology and proximity of hosts. *Oikos* 2013. 122(1), 73-83.

MONTENEGRO L. A., DAMASCENO D. N. F., ALMEIDA R. G., CHELLAPPA S. Biologia alimentar do mussum, *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795) (Osteichthyes: Synbranchidae) no açude Marechal Dutra localizado no semi-árido brasileiro. *Biota Amazônia* 2011. 1(2), 52-60.

MORAVEC, F. *Nematodes of freshwater fishes of the Neotropical Region*. Academia, Publishing House of the Academy of Sciences of the Czech Republic, 1998.

MORAVEC, F.; CHAUDHARY, A.; SINGH, H. S. *Heliconema monopteri* n. sp. (Nematoda: Physalopteridae) from *Monopterus cuchia* (Hamilton) (Osteichthyes: Synbranchidae) in India, with notes on the taxonomy of *Heliconema* spp. *Helminthologia*, 2019. 56(2) 124.

NIWIADOMSKA K. Superfamily Diplostomoidea Poirier, 1886. In: GIBSON D. I., JONES A., BRAY R. A. (Ed.). *Keys to the Trematoda. Volume 1*. Wallingford: CABI Publishing, p. 159-166. 2002.

PAVANELLI G. C., EIRAS J. C., TAKEMOTO R. M. *Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. Maringá: Eduem, 3ª ed. 311 p. 2008.

POULIN R. Body size vs abundance among parasite species: positive relationships? *Ecography* 1999., 22(3), 246-250.

POULIN R. Are there general laws in parasite ecology? *Parasitology* 2007.134(6):763-76.

POULIN R., GUILHAUMON F., RANDHAWA H. S., LUQUE J. L., MOUILLOT D. Identifying hotspots of parasite diversity from species–area relationships: host phylogeny versus host ecology. *Oikos* 2011., 120(5), 740-747.

REICZIGEL J., MAROZZI M., FÁBIÁN I., RÓZSA L. Biostatistics for Parasitologists - A Primer to Quantitative Parasitology. *Trends in Parasitology* 2019., 35(4):277-281.

VICENTIN W., VIEIRA K. R. I., COSTA F. E. D. S., TAKEMOTO R. M., TAVARES L. E. R., PAIVA F. Metazoan endoparasites of *Serrasalmus marginatus* (Characiformes: Serrasalminae) in the Negro River, Pantanal, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 2011. 20(1), 61-63.

VICENTIN W., VIEIRA K. R. I., TAVARES L. E. R., COSTA F. E. D. S., TAKEMOTO R. M., PAIVA F. Metazoan endoparasites of *Pygocentrus nattereri* (Characiformes: Serrasalminae) in the Negro River, Pantanal, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 2013. 22, 331-338.

Tabela 1. Prevalência, abundância média, intensidade média e sítio de infecção dos metazoários parasitos de *Synbranchus marmoratus* adquiridos em um comércio de iscas vivas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Taxa de parasitos	Prevalência (%)	Abundância Média ± DP	Intensidade Média ± DP	Sítio de Infecção
Pentastomida				
<i>Sebekia</i> sp. (larva)	35	0,90±3,34	2,57±3,44	Encistado na serosa dos órgãos e musculatura
Trematoda				
<i>Clinostomum</i> sp. (metacercária)	5	0,10±1,48	2,00±1,41	Cavidade abdominal
<i>Neascus</i> sp. (metacercária)	5	1,48±5,42	5,50±6,36	Encistado na serosa do intestino
Cestoda				
Proteocephalidae gen. sp. (adulto)	27,5	0,6±5,4	2±0,95	Intestino
Nematoda				
<i>Brevimulticaecum</i> sp. (larva)	5	0,08±0,96	0,71±0,08	Encistado no fígado e serosa do intestino
<i>Eustrongylides</i> sp. (larva)	5	0,05±0,55	1,00	Encistado na serosa do intestino
Camallanidae gen. sp. (adulto)	2,5	0,03±0,69	1,00	Aderido ao filamento branquial
Capillaridae gen. sp. (adulto)	25	0,33±0,71	1,30±0,68	Estômago e intestino
Myxozoa				
<i>Myxobolus</i> sp.	5	0,05±0,54	1±0,0	Encistado nas lamelas branquiais

Tabela 2. Índice de dispersão (ID) e índice de discrepância (D) dos metazoários parasitos de *Synbranchus marmoratus* adquiridos em um comércio de iscas vivas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Taxa de parasitos	ID	D
Pentastomida		
<i>Sebekia</i> sp. (larva)	6,090	0,798
Trematoda		
<i>Clinostomum</i> sp. (metacercária)	2,460	0,939
<i>Neascus</i> sp. (metacercária)	9,140	0,947
Nematoda		
<i>Brevimulticaecum</i> sp. (larva)	1,630	0,935
<i>Eustrongylides</i> sp. (larva)	0,970	0,927
Camallanidae gen. sp. (adulto)	1,000	0,951
Capillaridae gen. sp. (adulto)	1,320	0,773

Tabela 3. Correlação de Spearman entre a abundância das espécies de metazoários parasitos e o comprimento total (cm) de *Synbranchus marmoratus* adquiridos em um comércio de iscas vivas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Espécies	R_s	P
Pentastomida		
<i>Sebekia</i> sp. (larva)	0,363	<0,01*
Trematoda		
<i>Clinostomum</i> sp. (metacercária)	-0,163	0,314
<i>Neascus</i> sp. (metacercária)	-0,354	0,025*
Cestoda		
Proteocephalidae gen. sp. (adulto)	0,434	0,005
Nematoda		
<i>Brevimulticaecum</i> sp. (larva)	-0,079	0,627
<i>Eustrongylides</i> sp. (larva)	-0,074	0,647
Camallanidae gen. sp. (adulto)	-0,222	0,168
Capillaridae gen. sp. (adulto)	-0,042	0,795

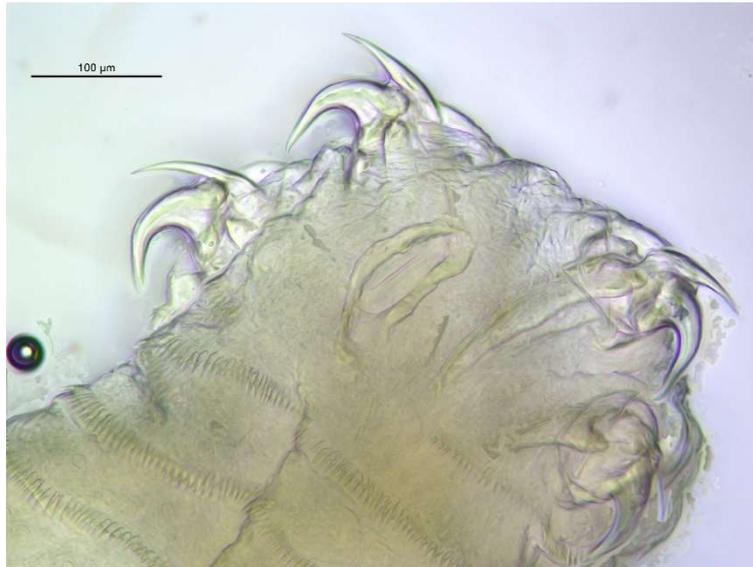


Figura 1: Imagem em microscopia de luz mostrando a extremidade anterior de *Sebekia* sp. parasito de *Synbranchus marmoratus* adquiridos em um comércio de iscas vivas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. (barra de escala = 100 μm).

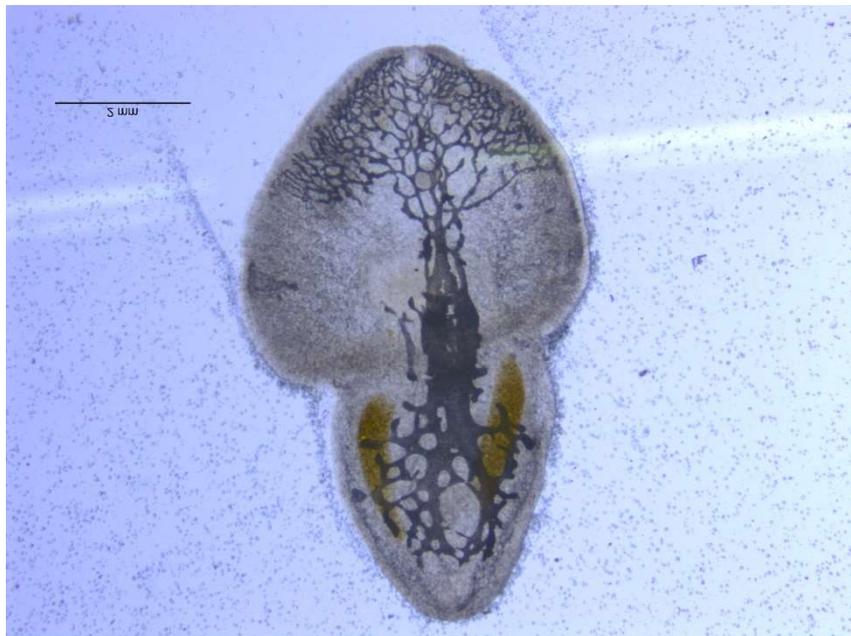


Figura 2: Imagem em microscopia de luz mostrando vista lateral de uma metacercária de *Neascus* sp. parasito de *Synbranchus marmoratus* adquiridos em um comércio de iscas vivas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. (Barra de escala = 2mm)

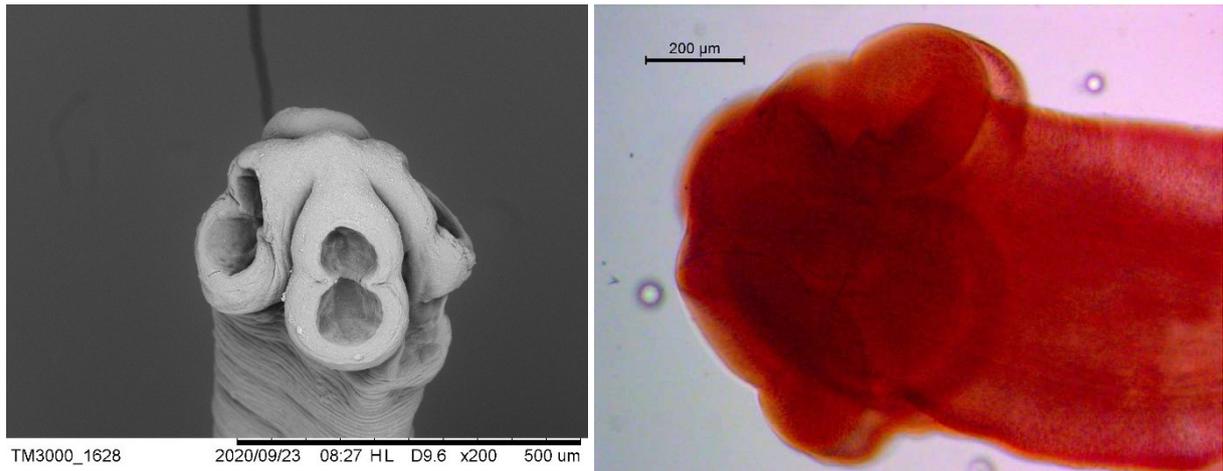


Figura 3: Imagem feita em Microscopia Eletrônica de Varredura (esquerda, barra de escala = 500 μm) e microscopia de luz (Direita, barra de escala = 200 μm) *Proteocephalidae* gen. sp. parasito de *Synbranchus marmoratus* adquiridos em um comércio de iscas vivas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. A) imagem em microscopia eletrônica de varredura mostrando o escólex com ventosas biloculadas; B) imagem em microscopia de luz mostrando o escólex.

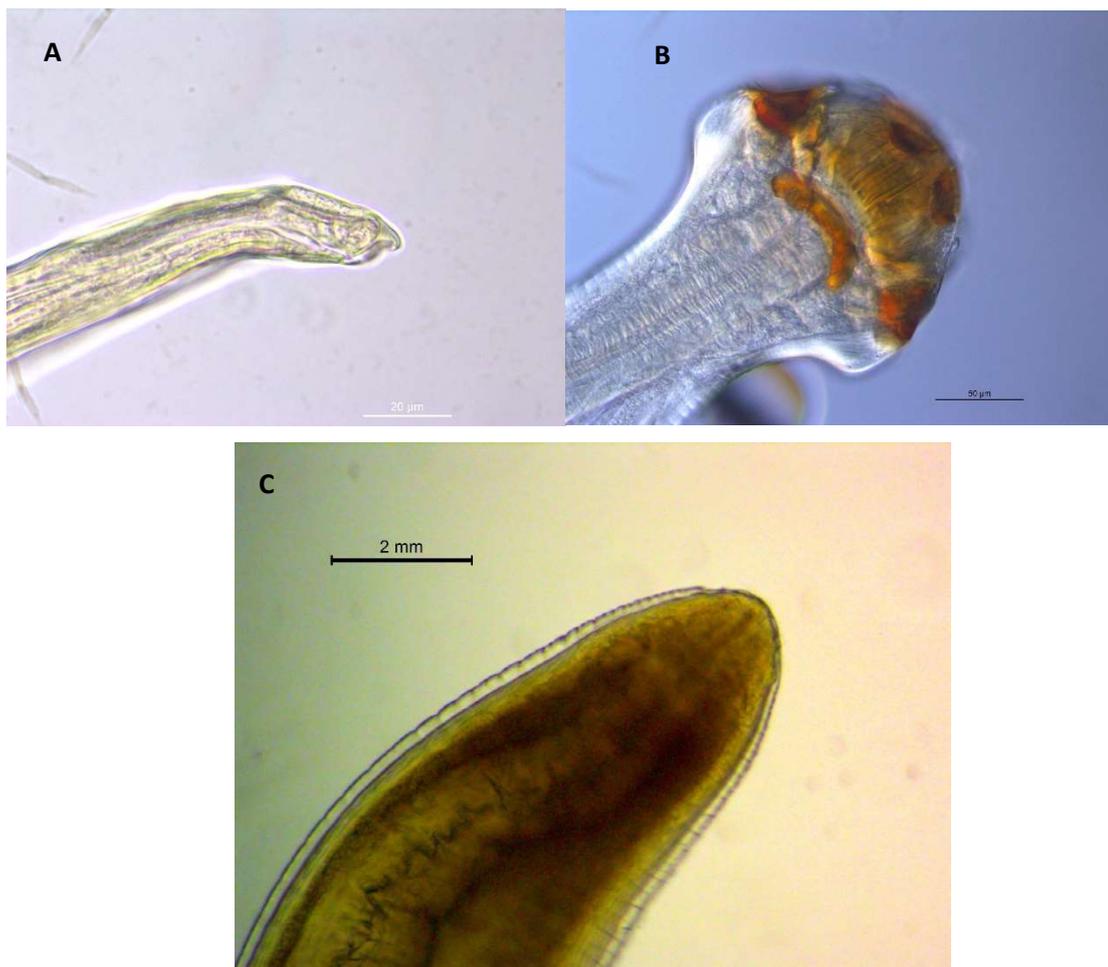


Figura 4: Imagem em microscopia de luz, vista lateral de Nematodas parasitos de *Synbranchus marmoratus* adquiridos em um comércio de iscas vivas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. A) Extremidade posterior de um macho de Capillaridae gen. sp. (Barra de escala = 20 µm; B) extremidade anterior de Camallanidae gen. sp. (Barra de escala = 50 µm; C) extremidade anterior de *Eustrongylides* sp. (Barra de escala = 2mm).

CAPÍTULO II: Caracterização Morfológica e molecular de dois gêneros de Nematoda encontrados parasitando *SYNBRANCHUS MARMORATUS* (ACTINOPTERYGII, SYNBRANCHIFORMES, SYNBRANQUIDAE), COLETADOS NO PANTANAL DE MATO GROSSO DO SUL, BRASIL.

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF TWO GENERA OF NEMATODA FOUND PARASITIZING *SYNBRANCHUS MARMORATUS* (ACTINOPTERYGII, SYNBRANCHIFORMES, SYNBRANQUIDAE), COLLECTED IN THE PANTANAL OF MATO GROSSO DO SUL, BRAZIL.

RESUMO

Este estudo teve por objetivo realizar análise morfológica e molecular dos nematodas do gênero *Eustrongylides* e da família Camallanidae. Foram examinados 40 espécimes adquiridos em um comércio local de iscas vivas no município de Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Após as análises morfológicas e moleculares não foi possível chegar na determinação específica para ambos os grupos amostrados. As sequências obtidas nesse estudo para *Eustrongylides* sp., apresentaram um agrupamento com outros gêneros depositados no GenBank. A sequência para Camallanidae foi comparada com outras sequências de espécies da família para os gêneros *Camallanus*, *Procamallanus* e *Spirocamallanus*, e não foram formados agrupamentos com tais espécies constituindo um grupo isolados das outras sequências analisadas, mesmo sendo pertencente à mesma família segundo a análise morfológica das estruturas esclerotizadas da extremidade anterior. Entretanto, o fato de ter sido coletado um único espécime de Camallanidae gen. sp., dificultou a proposição de um novo táxon. Poucos dados sobre esses grupos de metazoários, são encontrados como parasitos de *S. marmoratus*.

ABSTRACT

This study aimed to conduct morphological and molecular analyses of nematodes belonging to the genus *Eustrongylides* and the family Camallanidae. Forty specimens obtained from a local live bait shop in the municipality of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil, were examined. After both morphological and molecular analyses, it was not possible to determine the specific classification for the sampled groups. The sequences obtained in this study for *Eustrongylides* sp. showed clustering with other genera deposited in GenBank. The sequence for Camallanidae was compared with sequences from species of the family for the genera *Camallanus*, *Procamallanus*, and *Spirocamallanus*. No clusters were formed with these species, constituting an isolated group from the other analyzed sequences, even though they belong to the same family according to the morphological analysis of sclerotized structures at the anterior end. However, the collection of only one specimen of Camallanidae gen. sp. made it challenging to propose a new taxon. Limited data on these metazoan groups as parasites of *S. marmoratus* are available.

INTRODUÇÃO

O gênero *Synbranchus* é endêmico da América do Sul, Central e América do Norte até o México e compreende apenas três espécies reconhecidas, *S. lampreia*; *S. marmoratus* e *S. madeirae* (ROSEN; GREENWOOD, 1976; FROESE; PAULY, 2022). De acordo com Rosen e Greenwood (1976), o gênero é definido por uma série de caracteres, por exemplo, abertura branquial e aberta por dobras profundas e livre de istmo, cintura peitoral deslocada posteriormente para o nível da quinta ou sexta vértebra e osso pós-temporal reduzido a um caule simples sem conexão com ossos do peito do animal.

A espécie *Synbranchus marmoratus*, pertence à família Synbranchidae, que compreende 18 espécies dispostas em quatro gêneros (NELSON, 2006). Essa família ocorre em uma variedade de habitats, incluindo águas frescas e estuarinas da América Central e do Sul, África Ocidental, Ásia e no Arquipélago Indo-Australiano (NELSON, 2006). Várias espécies são bem conhecidas por seus hábitos “anfíbios” e pela presença de órgãos respiratórios acessórios (MUNSHI et al., 1989) que lhes permitem realizar excursões por terra. A relativa alta resistência à salinidade permite que os membros da família sobrevivam em diversos ambientes e possivelmente permite ao grupo uma ampla distribuição ecológica e geográfica (TYLER; FELLER, 1996).

Os estudos sobre nematodas em peixes brasileiros tiveram como ponto de partida a descrição de *Trichocephalus gibbosus* (atualmente *Oncophora melanocephala*) por Rudolphi (1819), com base em espécimes coletados de *Thunnus thynnus* na costa do Brasil. Os primeiros registros em peixes de água doce no Brasil sugerem ser de *Lecanocephalus spinulosus* (= *Goezia spinulosa*) e *Cheiracanthus gracilis* (= *Gnathostoma gracile*), ambas espécies descritas por Diesing (1839) acometendo *Arapaima gigas*. Anos mais tarde, foi o estudo de Travassos et al. (1928), que registrou uma grande riqueza de nematodas em peixes de água doce. A partir disso muitos estudos veem sendo publicados ao longo dos anos, os quais contribuem para o conhecimento desse grupo como parasitos em peixes (LUQUE et al., 2011).

Segundo Anderson e Bain (2019), a superfamília Dioctophymatoidea é dividida em duas famílias: Sobolophymatidae e Dioctophymatidae, estando a família Dioctophymatidae dividida nas subfamílias Dioctophymatinae e Eustrongylinae (ANDERSON; BAIN, 2009; GIBBONS, 2010). Na subfamília Eustrongylinae estão alocados os gêneros *Hystrichis* (que apresenta a região anterior dilatada, com fileiras de espinhos voltados posteriormente) e *Eustrongylides* (com a região anterior não dilatada e sem fileiras de espinhos), estando o gênero *Eustrongylidae* representado pelas espécies *E. excisus*, *E. ignotus* e *E. tubifex* (ANDERSON; BAIN, 2009; PEKMEZCI; BOLUKBAS, 2021). Para a região Neotropical, Moravec (1998) relatou a ocorrência de larvas de *E. ignotus* e *E. tubifex* parasitando peixes de água doce, sendo que Vicente et al. (1995) registraram a ocorrência de *E. ignotus* e *E. perpapillatus*, anos mais tarde que Vicente et al. (1999) e Luque et al. (2011) registraram a ocorrência de larvas de espécie não identificada do gênero *Eustrongylides* e larvas de *Eustrongylides ignotus* e *E. tubifex* (LUQUE et al. 2011).

A superfamília Camallanoidea é composta pela família Camallanidae, que está dividida nas subfamílias Camallaninae, com os gêneros *Camallanus*, com os subgêneros *Zeylanema*, *Neoparacamallanus* e *Neocamallanus*, Procamallaninae composta pelo gênero *Procamallanus* com os subgêneros *Procamallanus*, *Monospiculus*, *Isospiculus*, *Spirocamallanus*, *Spirocamallanoides*, *Punctocamallanus*, *Denticamallanus* e *Spirocotyle*, gênero *Onchocamallanus*, *Malayocamallanus*, *Platocamallanus* e *Batrachocamallanus*, Paracamallaninae com o gênero *Paracamallanus* e o subgênero *Detocamallanus* (CHABAUD, 2009; GIBBONS, 2010). Estudos recentes com o uso de ferramentas que integram aspectos morfológicos e genotípicos, têm demonstrado que *Procamallanus* e *Spirocamallanus* são gêneros distintos e que *Batrachocamallanus* deve ser considerado sinônimo desses dois últimos gêneros (AILÁN-CHOKE et al. 2019; AILÁN-CHOKE et al. 2020; AILÁN-CHOKE; PEREIRA, 2021).

A partir do exposto, com a finalidade de colaborar com o conhecimento sobre os representantes das famílias Dioctophymatidae e Camallanidae parasitos de *S. marmoratus* comercializados como iscas vivas no município de Campo Grande, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização morfológica e molecular de nematodas destas respectivas famílias.

MATERIAL E METODOS

Coleta dos Indivíduos e Morfologia

Foram adquiridos um total de 40 espécimes de *S. marmoratus*, de um comércio local de Isca-Viva no município de Campo Grande, que captura os exemplares em uma região do rio Miranda, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Os peixes foram transportados vivos para o Laboratório de Parasitologia Animal da UFMS, onde foram eutanasiados por transecção da coluna vertebral (os indivíduos não foram anestesiados por banho de imersão, para que não ocorresse alteração da fauna parasitária no epitélio branquial) (CONCEA, 2013). Em seguida foram pesados em balança eletrônica com aproximação de 0,01g, e a medida do comprimento total (cm) dos hospedeiros, verificando a presença de cistos ou ectoparasitos pelo corpo. Durante a necropsia expõem as brânquias e as vísceras, com finalidade de detectar eventuais alterações nas características dos órgãos e a presença de parasitos ou cistos (CARRIERO et al.; 2013). A cavidade do corpo foi aberta ventralmente e os órgãos internos foram colocados separadamente em placas de Petri contendo solução salina a 0,65%, em seguida os espécimes foram examinados para a detecção de endoparasitos. Estômago, ceco pilóricos e intestino foram abertos e examinados sob o auxílio de lupa estereoscópica.

Os nematodas encontrados vivos foram lavados com solução salina, fixados em solução quente de formaldeído a 4% aquecido e preservados em etanol a 70%, para morfologia e alguns fragmentos da região mediana do corpo foram fixados em etanol de 99% P.A. para estudos moleculares. As amostras para observação em microscopia de luz foram clarificadas em série crescente de glicerina. As amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram desidratadas por uma série de etanol graduado, secas por evaporação com hexametildisilazano, metalizadas com ouro e observadas em um JEOL JSM 6460-LV, a uma tensão de aceleração de 15kV ou no MEV de mesa Hitachi TM3000 com aceleração de voltagem com 5kV. A identificação morfológica dos nematodas foi realizada de acordo com Moravec et al. (1997), Moravec (1998), Anderson e Bain (2009), Chabaud (2009) e Gibbons (2010). Os dados morfométricos foram obtidos a partir de imagens capturadas no microscópio de luz Leica

DM5500B com contraste interferencial diferencial acoplado a uma câmera digital e analisados com o programa LAS (Leica).

Análise Molecular

O DNA foi extraído usando o kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. O gene amplificado parcialmente com reações de PCR foi 18S com os primers Nema18S (F18SrRNA Forward CGCGAATRGCTCATTACAACAGC) e Nema18SR (18SrRNA Reverse GGGCGG TATCTGATCGCC). As reações por PCR foram realizadas em um volume final de 25 μ L, contendo 1 μ L de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (10 μ M), 2,5 μ L de tampão (10x), 2 μ L de MgCl₂ em (50mM), 1 μ L de DNTPs (10mM), 0,5 μ L *Taq* DNA Polimerase (5U) (Invitrogen™), e 1 μ L de DNA (10ng) e as condições de reações foram de: ciclo inicial 95°C/3min., 35 ciclos de 94°C/30s, 42°C/30s, 72°C/1min e extensão final 72°C/5min. Como controle negativo das reações foram empregados água ultrapura livre de DNA.

Os produtos amplificados na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE (Tris-acetato de EDTA), corados com GelRed™ e observados em transiluminador UV Gel Doc (Bio-Rad®). Para o sequenciamento, os produtos foram purificados com 1 μ L ExoSAP-IT® (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA) acordo com as recomendações do fabricante, e encaminhados para sequenciamento pelo método de Sanger.

Após a extração, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento na ACTGene (Ludwig Biotec, Rio Grande do Sul, Brasil) com os mesmos primers utilizados nas reações de PCR. Com as sequências obtidas foram preliminarmente submetidas ao BLAST do banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), para confirmar a proximidade genética entre as sequências deste estudo, e as de demais espécies do gênero *Eustrongylides* e da família Camallanidae. As sequências obtidas e selecionadas foram analisadas no software Geneious v. 7.1.5.

As sequências foram alinhadas usando T-Coffee (Notredame et al., 2000), depois avaliadas pelo score de consistência transitiva, para verificar a confiabilidade das posições alinhadas, e com base nos valores das pontuações as posições alinhadas ambíguas foram aparadas (CHANG et al., 2014). Os conjuntos de dados foram submetidos a análises de máxima verossimilhança (MV) e inferência bayesiana, usando PHYML 3.1 (GUINDON; GASCUEL, 2003) e MrBayes 3.2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). O modelo de evolução e seus parâmetros fixos para cada conjunto de dados foram escolhidos e estimados sob o critério de

informação de Akaike com jModelTest 2 (GUINDON; GASCUEL, 2003; DARRIBA et al., 2012). Os apoios nodais para os valores de probabilidade posterior bayesiana foram determinados após a execução da cadeia de Markov Monte Carlo (2 corridas 4 cadeias) por 4 milhões de gerações, com frequência de amostragem a cada 4 mil gerações e descartando o 25% inicial das árvores amostradas como *Burn-in*. Para a máxima verossimilhança ele foi baseado em 500 replicações não paramétricas *bootstrap*. Sequências de *Trichuris trichiura* (MF288632.1) e *Cosmocercoides pulcher* (MH178326.1), foram utilizadas como grupo externo para o gênero *Eustrongylides* e para a família Camallanidae, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Superfamília Dioctophymatoidea

Família Dioctophymatidae

Subfamília Eustrongylinae

Gênero *Eustrongylides*

Espécie *Eustrongylides* sp. (larva)

Larva: cutícula finamente estriada transversalmente. Corpo alongado com as extremidades anterior e posterior rombas. Extremidade anterior com a abertura oral circundada pelo círculo externo com seis papilas mamilonadas (Figura 1 A e B, setas pretas) e círculo interno com seis papilas de ápice espiniforme (Figura 1 C, setas pretas); abertura bucal central, normalmente com fenda dorsoventral (Figura 1 D setas pretas). Anel nervoso próximo ao final da cavidade bucal. Os dados morfométricos estão apresentados na Tabela 2.

A extração do fragmento do gene 18S rRNA amplificou um total de 781 pares de bases. A sequência obtida apresentou identidade de 97,1% e e-value $2e^{-44}$, quando comparadas com aquelas sequências de *Eustrongylides* sp., e outras sequências do mesmo gênero disponibilizadas por Xing et al. (2013) e disponíveis no GenBank. Esses autores sequenciaram larvas em quarto estágio de desenvolvimento, provenientes de diferentes espécies peixes, e ficaram agrupadas em 3 clados diferentes correspondentes a duas espécies diferentes. Entretanto, estes autores não apresentaram dados morfológicos e morfométricos para dar suporte na identificação das espécies do gênero. Morfologicamente, as larvas encontradas no estudo se assemelham as larvas de *E. tubifex*, devido à presença de papilas com ápice espiniforme no círculo interno de papilas cefálicas, mas quando a sequência obtida foi comparada com as sequências de *E. ignotus* e de *E. tubifex*, a sequência obtida ficou distante destas espécies, e ficou próxima de outras sequências de espécies ainda não determinadas do

gênero. A análise filogenética realizada com base nas características genotípicas confirmam a posição taxonômica dos espécimes coletados dentro do gênero *Eustrongylides*. Todavia, a determinação específica não pôde ser realizada devido à ausência de espécimes adultos para confirmação das demais características morfológicas. Ressalta-se que a sequência obtida não foi agrupada com as sequências de outras larvas de *Eustrongilides* (XIONG et al. 2013), mas a combinação das análises morfológicas e moleculares se mostraram suficientes para indicar que a amostra pertence ao gênero (Figura 3).

Superfamília Camallanoidea

Família Camallanidae

Camallanidae gen. sp.

Espécime macho: cutícula finamente estriada. Corpo alongado com a extremidade anterior mais larga que a região esofageana, formando dois lobos laterais. Cápsula bucal dividida em duas valvas esclerotizadas laterais, um anel basal curto e tridentes bem desenvolvidos (Figura 3 A, B e D). Esôfago dividido em duas partes, com a porção muscular anterior mais curta que a porção glandular posterior. Poro excretor localizado após o anel nervoso que circunda a porção anterior do esôfago. Extremidade posterior afilada com dois espículos diferentes com a extremidade distal afilada, não sendo possível observar a presença de gubernáculo. Cauda voltada ventralmente com 12 pares de papilas, 4 pré-cloacais e 8 pós-cloacais e asa caudal (Figura 3 C). Os dados da morfométricos estão apresentados na Tabela 2.

A extração do fragmento do gene 18S rRNA amplificou um total de 822 pares de bases. A sequência obtida apresentou identidade de 95,7% e e-value 0,0.

A análise filogenética de Camallanidae fam. gen. sp., foi realizada com espécies de *Camallanus*, *Spirocamallanus* e *Procamalanus*, já que estas apresentaram maior similaridade pelo BLAST. Após a análise de verossimilhança e inferência bayesiana, a sequência obtida não agrupou com as sequências das espécies dos outros gêneros disponíveis GenBank, formando um clado separado (Figura 4). Mas devido a análise morfológica em comparação com outros estudos sobre a família Camallanidae, sabemos que a presente espécie está inserida dentro desta família. Devido ao fato de apenas um espécime de ter sido coletado, se faz necessária a coleta de mais amostras para novas análises moleculares, de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, para determinar a ocorrência de uma possível espécie nova.

Apesar de resultados não conclusivos, este estudo nos mostra o quão escassa são as informações sobre esses nematodas parasitos de *S. marmoratus*.

REFERÊNCIAS

AILÁN-CHOKE LG, DAVIES DA, TAVARES LER, PEREIRA FB. An integrative taxonomic assessment of *Procamallanus* (*Spirocamallanus*) *huacraensis* (Nematoda: Camallanidae), infecting the freshwater catfish *Trichomycterus spegazzinii* (Siluriformes: Trichomycteridae) in Argentina. *Parasitology Research* 2019. 118: 2819-2829.

AILÁN-CHOKE LG, TAVARES LER, LUQUE JL, PEREIRA FB. Integrative taxonomy assesses intraspecific variations of *Procamallanus* (*Spirocamallanus*) *inopinatus*, a common parasite in Neotropical freshwater fishes, and phylogenetic patterns of Camallanidae. *Parasitology* 2020. 147: 1752-1764.

AILÁN-CHOKE LG, PEREIRA FB. Deep in the systematics of Camallanidae (Nematoda): using integrative taxonomy to better understand the phylogeny and consistency of diagnostic traits. *Parasitology* 2021. 148: 962-974.

ANDERSON RC, BAIN O. Dioctophymatoidea, Trichinelloidea and Muspiceoidea IN: ANDERSON RC, CHABAUD AG, WILLMOTT S. (Eds.), *Keys to the nematode parasites of vertebrates*, CABI international, Oxfordshire 2009, pp. 18-29

CARRIERO MM, ADRIANO EA, SILVA MRM, CECCARELLI PS, MAIA AAM. Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with Several New South American Species 2013. *PLos One*. V.8(9): 1-12.

CHABAUD AG. Keys to the genera of the order Spirurida. Camallanoidea, Dracunculoidea, Gnathostomatoidea, Physalopteroidea, Rictularioidea and Thelazioidea. IN: ANDERSON RC, CHABAUD AG, WILLMOTT S. *Keys to the Nematode Parasite of Vertebrates* 2009. CIH. N° 3. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, pp. 1-27.

CHANG JM, DI TOMMASO P, NOTREDAME C. TCS: a new multiple sequence alignment reliability measure to estimate alignment accuracy and improve phylogenetic tree reconstruction. *Molecular Biology and Evolution* 2014. 31, 1625–1637.

DARRIBA D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 2012. 9, 772.

EKMEZCI GZ, BOLUKBAS CS. Morphological and molecular characterization of *Eustrongylides excisus* larvae (Nematoda: Dioctophymatidae) in *Sander lucioperca* (L.) from Northern Turkey. *Parasitology Research* 2021. 120, 2269–2274.

FROESE R, PAULY, D. (2022). *FishBase*. Disponível em: <<https://www.fishbase.org/Nomenclature/ScientificNameSearchList.php?>>

GIBBONS L. *Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates*. Supplementary Volume. Wallingford: CABI Publishing, 416 pp. 2010.

GUINDON S, GASCUEL O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 2003. 52, 696–704.

HUELSENBECK JP, RONQUIST F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 2001. 17, 754–755.

LUQUE JL, AGUIAR JC, VIEIRA FM, GIBSON DI, SANTOS CP. Checklist of Nematoda associated with the fishes of Brazil (*Zootaxa* 3082). 2011.

MORAVEC, F. *Nematodes of Freshwater Fishes of the Neotropical Region*, Academia. PRAHA, 1998.

MUNSHI JSD, HUGHES PGM, GEHR ER. Structure of the air-breathing organs of a swamp mud eel, *Monopterus albus*. *Japanese Journal of Ichthyology* 1989. 35:453-465.

NELSON JS. *Fishes of the World*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Hoboken. 2006;

NOTREDAME C, HIGGINS DG, HERINGA J. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology* 2000. 302, 205–217.

ROSEN DE, GREENWOOD PH. A fourth neotropical species of synbranchid eel and the phylogeny and systematics of synbranchiform fishes. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 1976. 157(1): 1-70.

TYLER JC, FELLER IC. Caribbean marine occurrence in mangroves of a typical fresh-water synbranchiform fish. *Gulf of Mexico Sciences* 1996. 14(1):26-30.

VICENTE JJ, PINTO RM. Nematóides do Brasil. Nematóides de peixes Atualização: 1985-1998. *Revta bras. Zool.* 1999. 16 (3): 561 - 610.

XIONG F, LI WX, WU SG, ZOU H, WANG G. Molecular phylogeny and host specificity of the larval *Eustrongylides* (Nematoda: Dioctophymidae) from freshwater fish in China. *Journal of Parasitology* 2013. 99: 137–144.

ZAR JH. *Biostatistical Analysis*. 4 ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River. 1999.

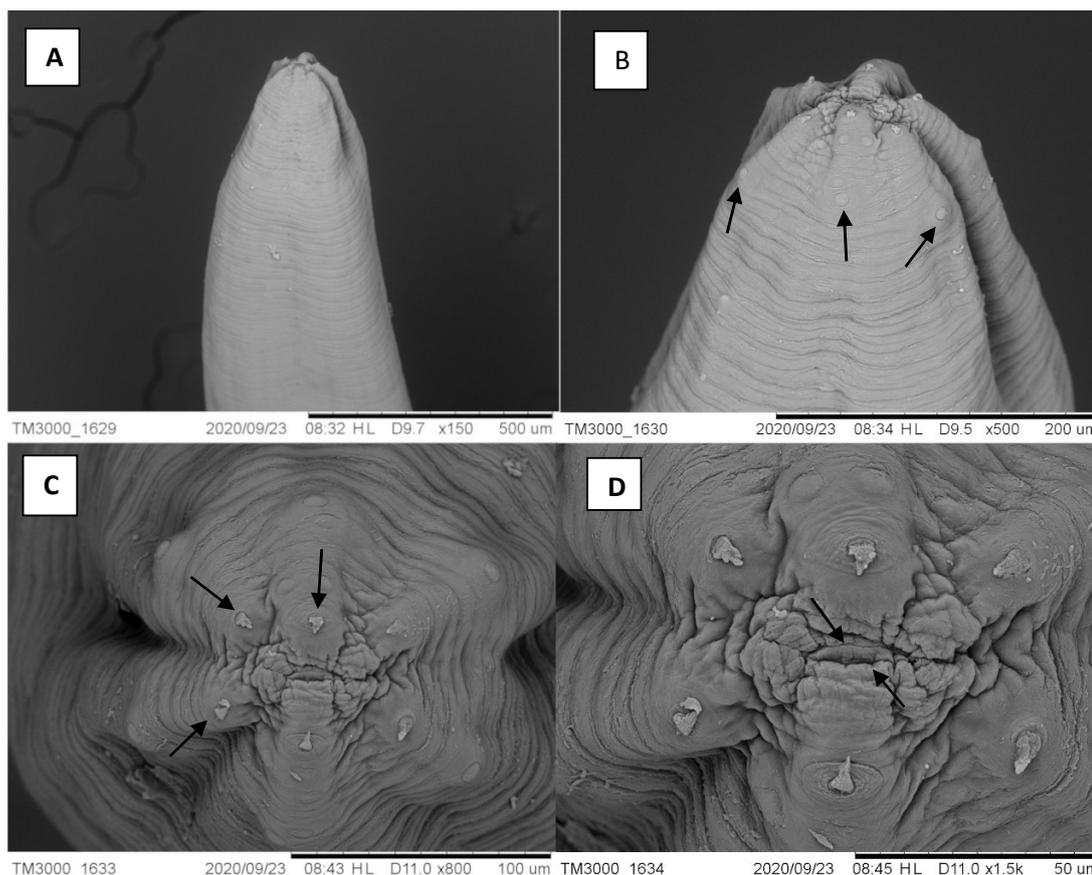


Figura 1: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *Eustrongylides* sp., parasito de *Synbranchus marmoratus* adquiridos em um comércio de iscas vivas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. A) e B) Extremidade anterior em vista lateral evidenciando as papilas presentes no círculo externo (seta preta). (Barra de escala = 500 µm e 200 µm); C) e D) Visão apical, mostrando as seis papilas do círculo interno ao redor da abertura bucal (barra de escala = 100 µm e 50 µm).

Tabela 2. Dados morfométricos de larvas *Eustrongylides* sp. parasito de *Synbranchus marmoratus* adquiridos em um comércio de iscas vivas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Medidas	(mm)
Comprimento do corpo	76,768
Largura do Anel nervoso	5,632
Comprimento do esôfago	15,03
Largura do esôfago	0,595

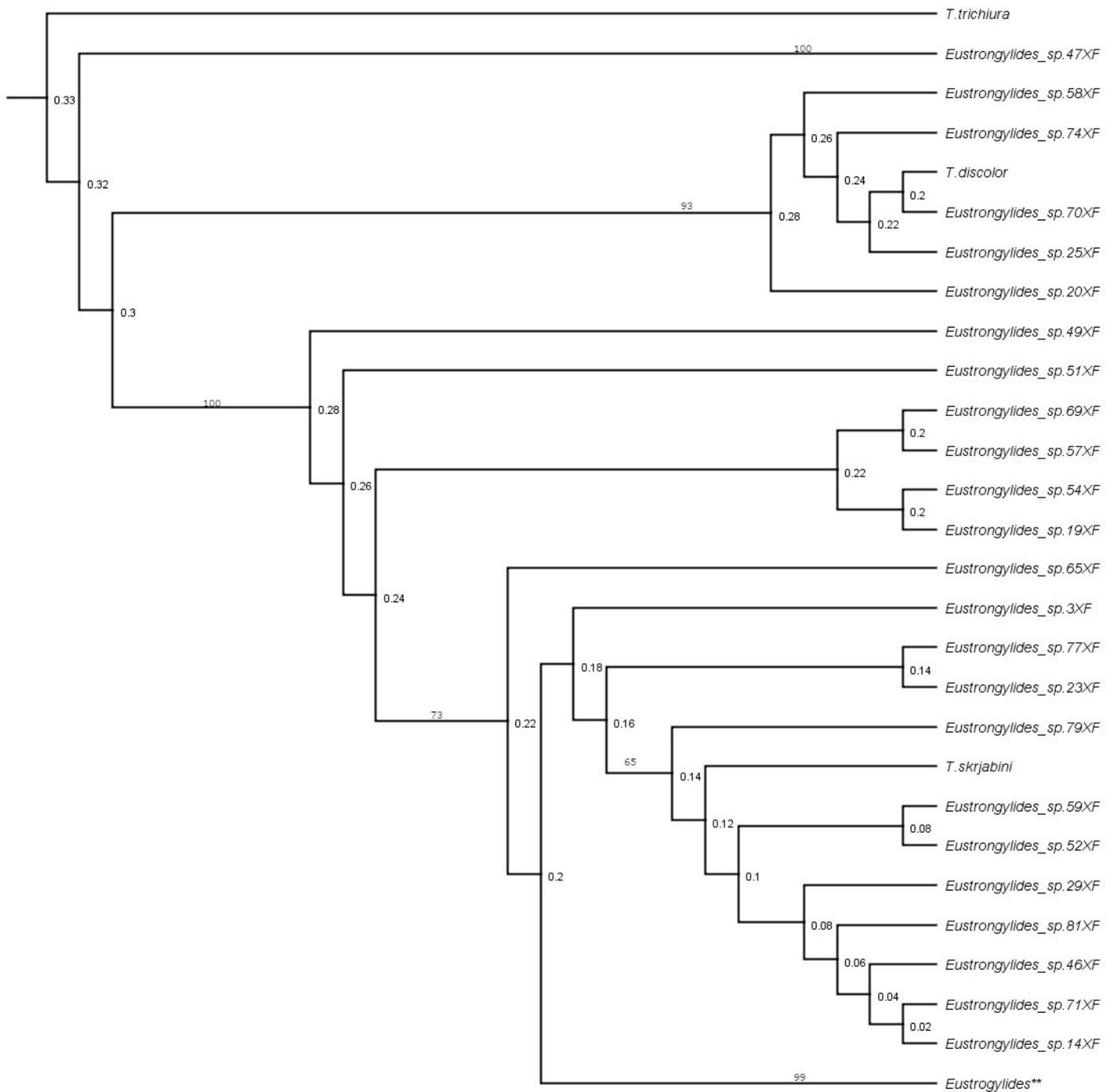


Figura 2: Árvore filogenética inferida usando método de máxima verossimilhança e inferência bayesiana, de *Eustrongylides* sp. parasito de *Synbranchus marmoratus* adquiridos em um comércio de iscas vivas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil,

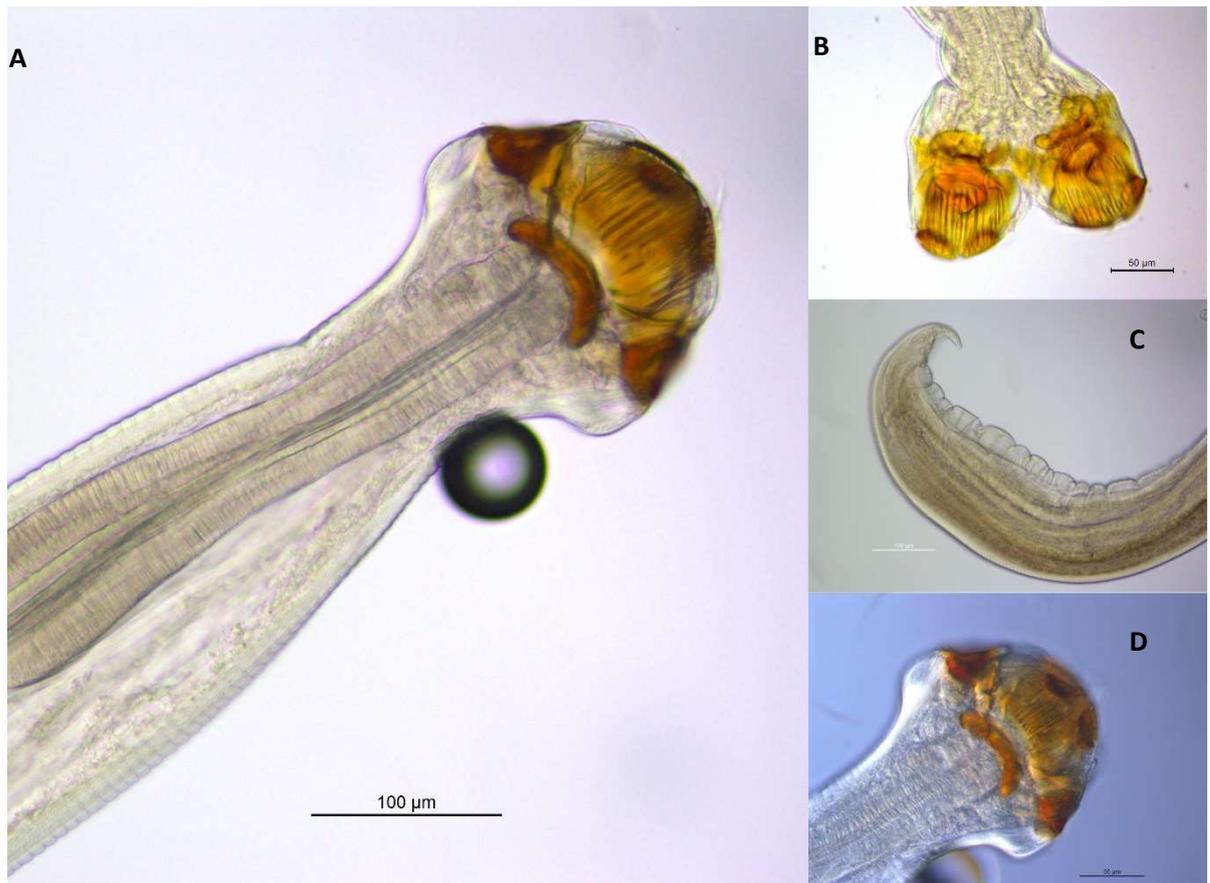


Figura 3: Micrografia de luz de Camallanidae gen. sp., macho, parasito de *Synbranchus marmoratus* adquiridos em um comércio de iscas vivas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. A) Extremidade anterior do corpo do macho, vista lateral (escala = 100 μm); B) cápsula bucal em vista ventral (escala = 50 μm); C) extremidade posterior do corpo do machos, vista lateral (escala = 100 μm); D) cápsula bucal em vista lateral (escala = 50 μm).

Tabela 2. Dados morfométricos de Camallanidae gen. sp., macho, parasito de *Synbranchus marmoratus* adquiridos em um comércio de iscas vivas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Características	(mm)	
Comprimento máximo	3,026	
Largura máxima	0,157	
Capsula bucal Largura	0,089	
Capsula bucal comprimento	0,066	
Anel basal Comprimento	0,087	
Anel basal Largura	0,016	
Comprimento dos tridentes	0,047	
Esôfago muscular comprimento	0,376	
Esôfago muscular largura	0,077	
Esôfago glandular comprimento	0,441	
Esôfago glandular largura	0,077	
Papilas caudais	4 pré	8 pós
Largura máxima anterior	0,176	
Espiculo Direito	0,334	
Espiculo esquerdo	0,27	
Cauda	0,117	
Anel nervoso à extremidade anterior	0,198	

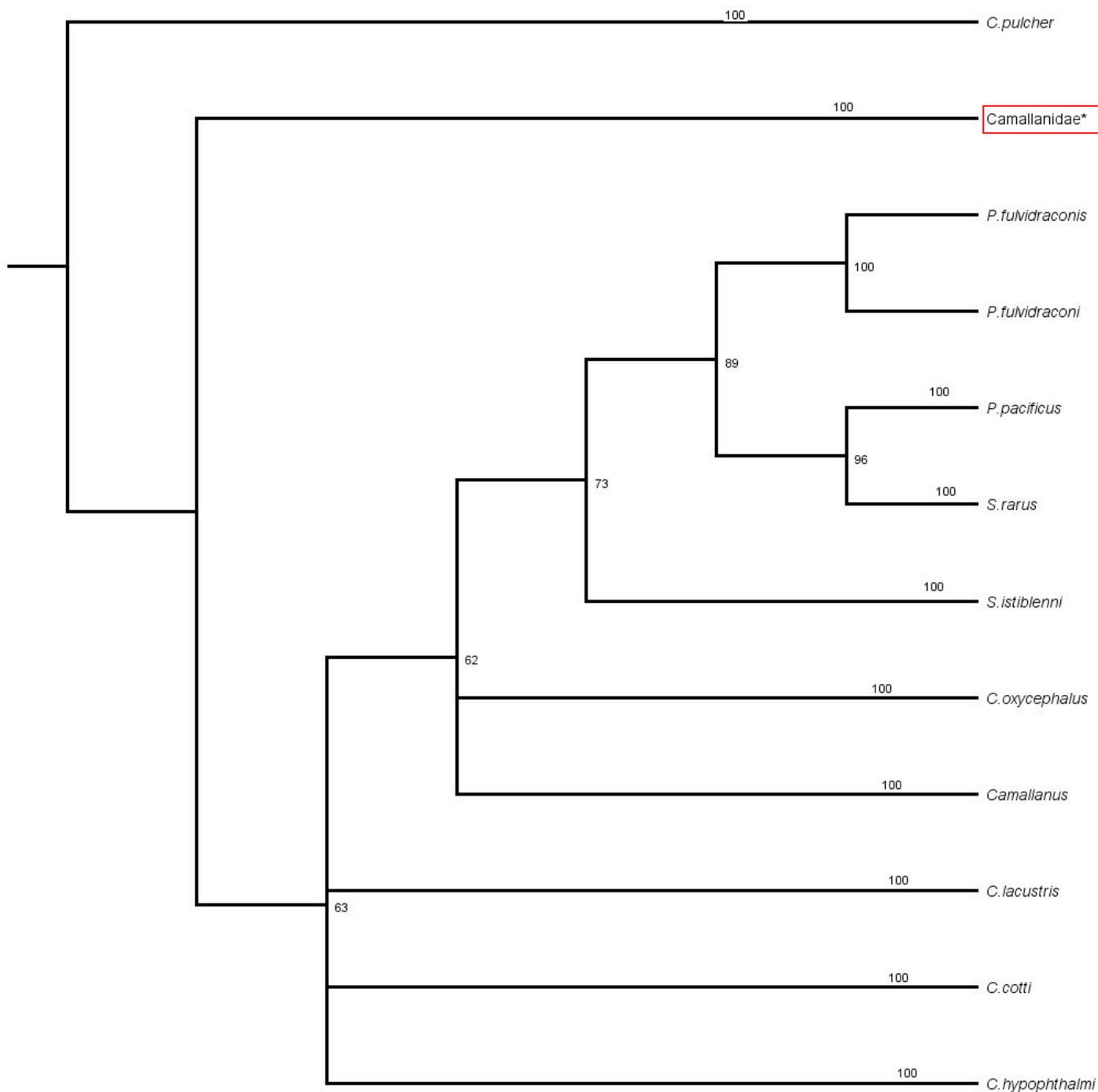


Figura 4: Árvore filogenética de Camallanidae gen. sp. parasito de *Synbranchus marmoratus* adquiridos em um comércio de iscas vivas no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Os suportes nodais são de inferência bayesiana.

Manuscript preparation (REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERIÁRIA)

The following guidelines should be followed during manuscript preparation:

All articles should be submitted in United States English. Always use concise and impersonal language. Footnotes should be placed at the bottom of the corresponding page and numbered with Arabic numerals in an ascending order. All manuscripts should be typed in Times New Roman font, size 12, page setup with 2.5-cm top and bottom margins, 3-cm left and right margins, and 1.5-cm line spacing. All pages should be numbered. Full Articles should be structured as follows: **Original Title (english), Translated Title (portuguese), Short Title (english), Author(s), Affiliations, Abstract (Keywords) (english), Resumo (Palavras-chave) (portuguese), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions** (or a combination of the last three), **Acknowledgements** (optional), and **References**. All tables and illustrations should be presented separately from the main text body and attached to the final manuscript without captions. The related captions should be included in the text after the References. Short Communications should follow the same structure as described above, but they can be presented as a continuous stream of text without the need to include headings. Short Communications should be concise and limited to 3,000 words, and can include up to 3 figures or tables, combined. Not more than 20 references should be cited.

Description of each item of the manuscript

Original title

The full title and subtitle, if any, should not exceed 20 words. The title should not include any abbreviations, and species names and Latin words should be italicized. Titles that start with “Preliminary studies,” “Notes about,” and the like should be avoided. Do not use the author’s name and date of citation in scientific names.

Author(s)/Affiliations

List all authors’ full name (with no abbreviations). Affiliations should include the original institution names, not their English translations, in the following order: laboratory, department, college or school, institute, university, city, state and country. Include at the bottom of the page the corresponding author information: full address, telephone number, current e-mail and ORCID, in that order.

Abstract

Abstracts are limited to 200 words and should be structured in a single paragraph with no indentation. The abstract should not include references. Acronyms or abbreviations should be written out in full and the abbreviation given in brackets the first time they are used in abstract, for example, indirect fluorescence assay (IFA). The abstract should be informative and present the objectives, a brief description of methods, the main results, and a

conclusion. All manuscripts written in English should also have the abstract and keywords written in Portuguese.

Keywords

Keywords should accurately reflect the text content. Limited to a maximum of 6 (six), and separated by comma.

Introduction

Should have a clear and concise justification of the study including its relevance and objectives and should keep the number of citations to a minimum.

Materials and Methods

A concise description including core information for the understanding and reproduction of the study. Well-established methods and techniques should be cited and referenced but not described. Statistical analyses should be described at the end of the section.

Results

The content of this section should be informative rather than interpretative. The results should be accompanied by self-explanatory tables, figures, or other illustrations if necessary.

Discussion

Its content should be interpretative and based on the study results only. The discussion can be a single section or it can be presented together with the results and conclusions. It should emphasize the relevance of new findings and new hypotheses clearly supported by the results.

Conclusions

All conclusions may be presented in the Discussion section or in the Results and the Discussion sections when presented together, at the authors' choice. If this is the case, there is no need for a separate Conclusions section.

Acknowledgments

Should be limited to a minimum.

References

Citations

All citations must follow the author–date system:

One author: author's name and year of publication
Levine (1985) or (Levine, 1985)

Two authors: authors' names and year of publication
Paim & Souza (2011) or (Paim & Souza, 2011)

Three or more authors: first author's name followed by et al. and year of publication
Araújo et al. (2002) or (Araújo et al., 2002)

References will only be accepted if they are reader-friendly. If it proves difficult for the RBPV to access these references, the authors may be asked to supply the material. If these references are unavailable, they will have to be removed from the text. References of papers published in conference proceedings will not be accepted and theses only if they are available for consultation at official websites such as the CAPES thesis bank: <http://www.capes.gov.br/servicos/banco-de-teses>. All cited references in the text should be carefully checked for the authors' names and dates exactly as they appear in the reference section. References should be listed alphabetically and then sorted chronologically, if necessary. More than one reference by the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a," "b," "c," etc., placed after the year of publication. Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus, <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>.

In the Reference section, all authors should be listed up to a limit of six authors. If more than six authors, the first six authors should be listed followed by et al.:

Reference to book

Levine JD. *Veterinary protozoology*. Ames: ISU Press; 1985.

Reference to book chapter

Menzies PI. Abortion in sheep: diagnosis and control. In: Youngquist RS, Threlfall WR. *Current therapy in large animal theriogenology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 667-680.

Reference to full article

Munhoz AD, Simões IGPC, Calazans APF, Macedo LS, Cruz RDS, Lacerda LC, et al. Hemotropic mycoplasmas in naturally infected cats in Northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2018; 27(4): 446-454. <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-296120180074>.

Reference to thesis or dissertation

Araujo MM. *Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de patos, Paraíba - Brasil* [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2002.

Reference to internet URLs

Centers for Disease Control and Prevention. *Epi Info* [online]. 2002 [cited 2003 Jan 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>.

Tables

They should have horizontal rules separating the header and the last row. The word "Table" should precede the table title. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and have a concise and descriptive title placed above them. The number of tables in the manuscript should be limited to a minimum.

Figures

Figures consist of drawings, photographs, boards, charts, flow charts, and diagrams and should be supplied in .tif, .eps or .pdf format with a minimum resolution of 300 dpi. Only figures of high quality will be accepted. They should be numbered consecutively with Arabic numerals and the word "Figure" should precede the legend placed below them. List all numbered legends with their symbols and standard icons in a separate file with double spacing. Figures should be limited to a minimum. Digital pictures should be supplied in separate files. A graphic bar scale instead of a numerical one should be used in all illustrations, as it can be adjusted with size reduction.

Layout proof

The final layout of the article in PDF format will be provided by email to the corresponding author. Changes to the article accepted for publication will only be considered at this stage if permission from the Editor is granted. The proof must be carefully checked for accuracy as inclusion of subsequent corrections (e.g., a new author, change of paragraphs or tables) cannot be guaranteed.