

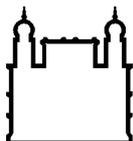
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ACANTOCÉFALO DE *ORTHOPRISTIS RUBER* (CUVIER, 1830)
(HAEMULIDAE): TAXONOMIA INTEGRATIVA, ULTRAESTRUTURA E
VIABILIDADE COMO SENTINELA DE ECOSSISTEMA MARINHO

LUCAS KEIDEL OLIVEIRA

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LUCAS KEIDEL OLIVEIRA

ACANTOCÉFALO DE *ORTHOPRISTIS RUBER* (CUVIER, 1830) (HAEMULIDAE): TAXONOMIA INTEGRATIVA, ULTRAESTRUTURA E VIABILIDADE COMO SENTINELA DE ECOSSISTEMA MARINHO.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dra. Claudia Portes Santos Silva

RIO DE JANEIRO

Fevereiro de 2019

Oliveira, Lucas Keidel.

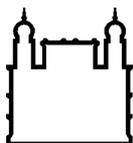
Acantocéfalo de *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1830) (Haemulidae): taxonomia integrativa, ultraestrutura e viabilidade como sentinela de ecossistema marinho / Lucas Keidel Oliveira. - Rio de Janeiro, 2019. xvi, 57f f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2019.

Orientadora: Cláudia Portes Santos Silva.

Bibliografia: f. 49-57

1. Helmintos. 2. Peixes. 3. Metais traço. 4. Taxonomia. 5. Bioindicador. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: LUCAS KEIDEL OLIVEIRA

Acantocéfalo de *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1830) (Haemulidae): taxonomia integrativa, ultraestrutura e viabilidade como sentinela de ecossistema marinho

ORIENTADOR: Prof. Dra. Claudia Portes Santos Silva

Aprovada em: 19/02/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Helene Santos Barbosa – Presidente Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz

Prof. Dra. Daniela Leles de Souza – Universidade Federal Fluminense

Prof. Dra. Micheli da Silva Ferreira Ascoli – Universidade Federal Fluminense

Prof. Dra. Melissa Querido Cárdenas – Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz

Prof. Dr. Wendell Girard Dias – Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz

Rio de Janeiro, 19 de Fevereiro de 2019

À professora Beatriz Brener de Figueiredo da Universidade Federal Fluminense. Minha admirável mentora.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora do mestrado, Dr^a Cláudia Portes Santos Silva do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA) do Instituto Oswaldo Cruz, pela dedicação, profissionalismo e ensinamentos. Muito grato por ter aprendido e amadurecido em seu laboratório.

À Beatriz Brener de Figueiredo da Universidade Federal Fluminense. Digna dos mais sinceros e incansáveis agradecimentos. A cada momento entre o trabalho e uma conversa, com pequenas pausas para um café, transformam meus dias em uma revigorante fonte de inspiração, estímulo, alegria e aprendizado.

Aos meus companheiros no LAPSA, que contribuíram, mesmo que de formas diferentes, porém únicas: Ana Cristina, Ana Carolina, Juliana, Amanda, Everton, Maralina e Pedro. Especialmente Carol por muitas das vezes interromper o seu trabalho para me ensinar sem nunca tirar o sorriso do rosto, Juliana que muito solícita estava sempre disposta a me socorrer e ao Everton que me acudiu com análises estatísticas.

Aos colaboradores, Gerardo Pérez Ponce de León e Martín García Varela da Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por terem aceitado e participado do meu trabalho.

A Micheli da Silva Ferreira Ascoli e Eliane Teixeira Mársico da Universidade Federal Fluminense (UFF) e Tatiana Dillenburg Saint'Pierre da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ) por terem me recebido de portas abertas em seus laboratórios e contribuído com seu tempo e sabedoria.

A todos das Plataformas de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz e PDTIS- Sequenciamento da Fiocruz, especialmente ao Wendell Girard Dias por ter me ajudado muito nas análises que envolviam operar o microscópio eletrônico.

À Leticia Oliveira de Assis, companheira de muitos anos na jornada desta vida, pelo carinho.

À minha mãe Mariluce Keidel, minha avó Maria Marly Dias Keidel e meu pai e avô Henrique Walter Keidel (*in memoriam*), pela vida, educação, formação, carinho, amor

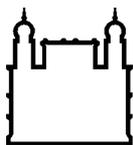
e por todos os sacrifícios e tudo mais um pouco daquilo que precisei para estar completando este ciclo e aqueles que estarão por vir.

A toda minha turma da Biologia Parasitária, especialmente Juliana, Paolla, Paloma e Luciana pela amizade e risadas não somente nos momentos felizes, mas também nos de dificuldades.

Aos coordenadores do programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, especialmente a nossa secretária Rita, pela ajuda em todos os momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e PAEF/IOC, Fiocruz pelo auxílio financeiro.

“Complicar uma receita é a melhor maneira de disfarçar a ausência de talento. Sejam simples”. (Alex Atala).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

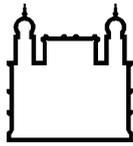
ACANTOCÉFALOS DE *ORTHOPRISTIS RUBER* (CUVIER, 1830) (HAEMULIDAE): TAXONOMIA INTEGRATIVA, ULTRAESTRUTURA E VIABILIDADE COMO SENTINELA DE ECOSISTEMA MARINHO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Lucas Keidel Oliveira

Orthopristis ruber, um peixe vulgarmente conhecido como cocoroca, tem ampla distribuição geográfica e já foi utilizado em testes de bioacumulação. Na Baía de Guanabara estes peixes são frequentemente encontrados parasitados por helmintos acantocéfalos do gênero *Dollfusentis* que apresentam dificuldades para separar espécies devido a sobreposição de caracteres morfológicos. Embora os acantocéfalos sejam empregados como bioindicadores ambientais, ainda não existem análises com acantocéfalos de peixes marinhos no Brasil. O objetivo deste estudo foi realizar uma análise taxonômica integrativa de *Dollfusentis* sp. coletados de *O. ruber* na região da Urca, na Baía de Guanabara e investigar os elementos traço nos parasitos e tecidos do hospedeiro. Para fins taxonômicos, espécimes de *Dollfusentis* sp. foram coletados de *O. ruber* na Urca e *Dollfusentis bravoae* de *Eugerres plumieri* do México. Os espécimes foram medidos, sua ultraestrutura analisada por microscopia eletrônica de varredura e seu DNA foi extraído, amplificado e sequenciado. Os elementos traço foram analisados no material do Brasil através da microscopia eletrônica de varredura associada a espectroscopia por meio de energia dispersiva de raios X (MEV-EDS). A análise dos parasitos revelou a presença de nova espécie de *Dollfusentis* caracterizada por ter tronco armado com espinhos longos distribuídos do pescoço até quase o final do receptáculo da probóscida. A probóscida longa tem 12-14 fileiras longitudinais com 16-17 ganchos e 8 ganchos ventrais crescentes. Os lemniscos ultrapassam o receptáculo. Aspectos ultraestruturais da nova espécie e de *D. bravoae* foram apresentados. Novas sequências de 18S rDNA, ITS1 5.8 e ITS2, 28S rDNA e COI mtDNA foram obtidas e depositadas no GenBank; árvores filogenéticas foram inferidas por máxima verossimilhança. A análise por MEV-EDS identificou 15 elementos nos parasitos e peixes: Carbono (C), Nitrogênio (N), Oxigênio (O), Magnésio (Mg), Alumínio (Al), Silício (Si), Fósforo (P), Enxofre (S), Potássio (K), Cálcio (Ca), Ferro (Fe), Zinco (Zn), Cloro (Cl), Cobre (Cu) e Sódio (Na). Nos acantocéfalos, Ca, Mg e Si podem estar relacionados a alta capacidade de contração dos parasitos. A comparação dos elementos essenciais reforçou a dinâmica de interação parasito-hospedeiro na captação por nutrientes onde Si, Zn e Cu foram mais prevalentes nos parasitos e Mg, P, K, Ca e Fe mais significativos nos peixes. A detecção do Al, nos acantocéfalos e peixes pode estar associada a contaminação ambiental regional. Os acantocéfalos mostraram ser mais sensíveis na detecção de Zn e Cu podendo ser considerados promissores sentinelas para monitoramento ambiental na região.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ACANTOCEPHALAN OF *ORTHOPRISTIS RUBER* (CUVIER, 1830): INTEGRATIVE TAXONOMY, ULTRASTRUCTURAL AND VIABILITY AS MARINE ECOSYSTEM SENTINEL

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Lucas Keidel Oliveira

Orthopristis ruber, a fish commonly known as grunt, has a wide geographical distribution, has already been used in bioaccumulation tests. In Guanabara Bay, these fish are frequently found parasitized by helminth acanthocephalans of the genus *Dollfusentis*, which presents taxonomic difficulties to separate species due to the overlapping of morphological characters. Although acanthocephalans are employed as environmental bioindicators, there are still no analyzes with acanthocephals of marine fish in Brazil. The objective of this study was to carry out an integrative taxonomic analysis of *Dollfusentis* sp. collected from *O. ruber* in the region of Urca, Guanabara Bay, and to investigate trace elements of host tissues and parasites. For comparative taxonomic purposes, specimens of *Dollfusentis* sp. were collected from *O. ruber* in Urca and *Dollfusentis bravoae* collected from *Eugerres plumieri* of Mexico. The specimens were measured, their ultrastructure analyzed by scanning electron microscopy and their DNA was extracted, amplified and sequenced. The trace elements were analyzed only in the Brazilian material through scanning electron microscopy associated with X-ray energy dispersive spectroscopy (SEM-EDS). The analysis of the acanthocephalans revealed the presence of a new species of *Dollfusentis*, which is characterized by having a trunk armed with long spines distributed from the neck to almost the end of the receptacle of the proboscis. The long proboscis has 12-14 longitudinal rows with 16-17 hooks and 8 crescent ventral hooks, and the lemnisci are longer than the receptacle. New genetic sequences of 18S rDNA, ITS1 5.8 and ITS2, 28S rDNA and COI mtDNA were obtained and deposited in GenBank. New ultrastructural aspects of the new species and *D. bravoae* were presented with phylogenetic trees inferred by maximum likelihood. The analysis by MEV-EDS identified 15 elements in fish tissues and parasites: Carbon (C), Nitrogen (N), Oxygen (O), Magnesium (Mg), Aluminum (Al), Silicon (Si), Phosphorus (P), Sulphur (S), Potassium (K), Calcium (Ca), Iron (Fe), Zinc (Zn), Chlorine (Cl), Copper (Cu) and Sodium (Na). In the acanthocephalans, the Ca, Mg and Si may be related to the high contraction capacity characteristic of these parasites. A comparison of the essential trace elements reinforced the dynamics of parasite-host interaction in nutrient uptake, where Si, Zn and Cu were more prevalent in the parasites while Mg, P, K, Ca and Fe were more significant in fish. Detection of Al, a non-essential element, in both acanthocephalans and fish, may be associated with regional environmental contamination. The acanthocephalans showed to be more sensitive in the detection of Zn and Cu and could be considered promising sentinels for environmental monitoring in the region.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Filo Acanthocephala	3
1.1.1 Classificação Taxonômica.....	3
1.1.2 Biologia e ciclo biológico	4
1.1.3 Morfologia do helminto adulto	7
1.2 <i>Orthopristis ruber</i>	12
1.2.1 Acantocéfalos de <i>Orthopristis ruber</i>	12
1.3 Microanálise de elementos químicos por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS)	13
1.4 Justificativa	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Hospedeiro	16
3.2 Parasitos	16
3.3 Identificação Taxonômica	17
3.3.1 Morfologia e Morfometria	17
3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	17
3.3.3 Índices Ecológicos.....	18
3.3.4 Análise Molecular e Filogenética.....	18
3.4 Elementos Traço	21
3.4.1 Microanálise de elementos por Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)	21
4 RESULTADOS	23
4.1 Hospedeiros e Parasitos	23
4.2 <i>Dollfusentis n. sp.</i>	23

4.2.2 Ultraestrutura	25
4.2.3 Diagnose Diferencial	29
4.2.4 Análise Filogenética	29
4.2.5 Resenha taxonômica.....	30
4.3 Elementos traço.....	34
4.3.1 Acantocéfalos e Peixes	34
5 DISCUSSÃO	41
5.1 Taxonomia Integrativa.....	41
5.2 Elementos traço.....	45
6 CONCLUSÕES	48
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo biológico de um acantocéfalo: (A) Parasitos machos e fêmeas no interior do hospedeiro definitivo. (B) Ovo com larva acantor no seu interior eliminado junto com as fezes do seu hospedeiro definitivo. (C) Artrópode, hospedeiro intermediário infectado com larva acantela. (D) Hospedeiro paratênico/transporte contendo a larva cistacanto. Adaptado de Santos et al. (2013)6

Figura 2 Divisão do corpo dos acantocéfalos adultos com a região anterior ou presoma onde se localizam a probóscida (Pr), pescoço (Ps), receptáculo da probóscida (RP), gânglio nervoso (G) e leminiscos (L) e a região posterior ou metasoma com os órgãos reprodutores: T = testículo; G. ciment = glândulas de cimento; O. saf. = órgão de Saefftingen; BC = bolsa copuladora; Mo = massas ovíferas; Camp. Uter. = campânula uterina; Ap. sel. = aparelho seletor de ovos; U = útero; V = vagina. Adaptado de Santos et al. (2013)..... 8

Figura 3 Presoma de *Dollfusentis chandleri*. Esquema mostrando as estruturas localizadas no presoma. Modificado de Golvan (1969).....9

Figura 4 Sistema Reprodutor de *Palaeacanthocephala*. T. ant = testículo anterior; T. post = testículo posterior; C. efent.= canais eferentes; G. ciment = glândulas de cimento; O. Saf.= órgão de Saefftingen; V. sem.= vesícula seminal; C.m.= camada muscular da bolsa copuladora; Pen = pênis; Bc = parte membranosa da Bolsa copuladora; Lig = ligamento; Camp. uter.= campanula uterina; Div = divertículo; Ap. sel.= aparelho seletor; Útero; Esfincter vaginal interno e externo; Bulb= bulbo vaginal. Modificado de Golvan (1969) 11

Figura 5 Espécime adulto de *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1830).Erro! Indicador não definido.

Figura 6 *Dollfusentis* n. sp. (A) Macho vista total, tronco com presença de espinhos na parte anterior, probóscida, receptáculo, leminiscos, testículos, glândulas de cimento, vesícula seminal, órgão de Saefftingen e bolsa copuladora evertida; (B) detalhe da região anterior com arranjo dos ganchos da probóscida e espinhos do

tronco; (C) Diferentes tamanhos dos espinhos do tronco; (D) Fêmea, vista total; (E) Detalhe do aparelho reprodutor de uma fêmea; (F) Ovo. Barras: A = 1000 μm ; B = 500 μm ; C = 300 μm ; D = 1000 μm ; E = 500 μm ; 50 μm**26**

Figura 7 Microscopia eletrônica de varredura de *Dollfusentis* n. sp. (A) Probóscida com 16 ganchos (setas); (B) Probóscida, pescoço e tronco armado anteriormente com grandes espinhos anteriores reduzindo em tamanho; (C) ganchos ventrais crescentes, pescoço e espinhos anteriores do tronco; (D) gancho ventral crescente (seta) espaçado dos ganchos basais (asterisco) (E) porção posterior de uma fêmea; (F) bolsa copuladora evertida com espinhos na porção posterior do tronco e dirigidos para porção anterior. Barras: A = 100 μm ; B = 200 μm ; C = 100 μm ; D = 500 μm ; E–F = 100 μm**27**

Figura 8 Microscopia eletrônica de varredura de *Dollfusentis bravoae*. (A) Probóscida com 16 ganchos (setas); (B) Probóscida, pescoço e tronco armado anteriormente; (C) ganchos ventrais crescentes (seta) espaçados dos ganchos basais da próscida (estrela); (D) porção posterior do tronco armado com espinhos direcionados para porção anterior e bolsa copuladora evertida. Barras: A = 100 μm ; B = 500 μm ; C = 40 μm ; D = 100 μm**28**

Figura 9 Árvore filogenética por Máxima Verossimilhança referente ao 18S rDNA. Números mostram valores de *bootstrap* inferidos por 10.000 replicatas. Área cinza refere-se as espécies inclusas na família Illiosentidae em comparação com outros membros da classe Palaeacanthocephala.....**31**

Figura 10 Árvore filogenética por Máxima Verossimilhança referente ao 28S rDNA. Números mostram valores de *bootstrap* inferidos por 10.000 replicatas. Área cinza refere-se as espécies inclusas na família Illiosentidae em comparação com outros membros da classe Palaeacanthocephala.....**32**

Figura 11 Árvore filogenética por Máxima Verossimilhança referente a região COI mtDNA. Números mostram valores de *bootstrap* inferidos por 10.000 replicatas. Área cinza refere-se as espécies inclusas na família Illiosentidae em comparação com outros membros da classe Palaeacanthocephala.....**33**

Figura 12 Microscopia eletrônica de varredura de *Dollfusentis* sp. (A) Macho, vista total; (B) Separação entre os ganchos basais e ventral crescente; (C) Probóscida com 16 ganchos, pescoço inerme e tronco armado na região anterior.....**35**

Figura 13 Micrografia das amostras utilizadas no MEV-EDS. Pontos 1, 2 e 3 correspondem a área de análise selecionada para obtenção dos espectros. (A) probóscida; (B) região mediana do tronco; (C) região posterior do tronco; (D) fígado; (E) musculatura; (F) brânquia.....**36**

Figura 14 Microanálise qualitativa (espectros) obtidos por MEV-EDS no acantocéfalo e fígado do peixe *Orthopristis ruber*.**37**

Figura 15 Microanálise qualitativa (espectros) obtidos por MEV-EDS no músculo e brânquia do peixe *Orthopristis ruber*.**38**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Acantocéfalos utilizados nas análises filogenéticas20

Tabela 2 Prevalência (%) de amostras positivas para cada elemento.....39

Tabela 3 Análise semi-quantitativa (wt%) de cada elemento traço identificado nas amostras. Dados expressos em média seguido de desvio padrão. n = número de espectros analisados.....39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µl	Microlitro
µm	Micrômetro
AFA	Solução de Ácido Acético Glacial, Formalina e Etanol
ANOVA	Análise de Variância
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CHIOC	Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz
CO ₂	Dióxido de carbono
COI	Cytochrome c oxidase I
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ITS	Espaçador interno transcrito
LAPSA	Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mm	Milímetro
mtDNA	DNA mitocondrial
NaCl	Cloreto de sódio
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação da Polimerase em Cadeia)
Pmol	Picomol
rDNA	DNA ribossomal
UFF	Universidade Federal Fluminense
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Luz Ultravioleta
Wt%	“Weight percent”
RJ	Rio de Janeiro
CNHE	Colección Nacional de Helminfos

1 INTRODUÇÃO

A Baía de Guanabara, localizada na região litoral do estado do Rio de Janeiro, possui extensa dimensão territorial e ostenta grande importância ecológica e sócio econômica, já que apresenta uma rica diversidade de fauna e flora. Além disso, está rodeada por grandes centros urbanos e industriais e suas águas são frequentemente utilizadas pela população seja de forma direta como, por exemplo, atividades de lazer e turísticas ou indireta pelo consumo de pescado (Kehrig et al. 2010; Fistarol et al. 2015). Entretanto, apesar do seu valor e relevância, também é caracterizada por ser uma das regiões mais impactadas do litoral brasileiro, já que muitos resíduos principalmente oriundos das atividades antrópicas desaguam na baía, sem tratamento adequado (Soares-Gomes et al. 2016).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos para avaliar a qualidade ambiental da Baía de Guanabara (Baptista-Neto et al. 2006; Soares-Gomes et al. 2010; Abreu et al. 2016; de Carvalho Aguiar et al. 2016; de Carvalho Aguiar et al. 2018). Estes autores, salientaram que os efluentes oriundos das atividades de indústrias, agricultura e da densa urbanização expõem a saúde animal e humana, que utilizam estas águas como fonte de subsistência, a altos níveis de poluentes biológicos, como bactérias patogênicas e multirresistentes (Coutinho et al. 2014) e químicos principalmente por metais traço, como chumbo (Pb), cobre (Cu), zinco (Zn), alumínio (Al) e mercúrio (Hg).

A poluição por metais traço em ambientes aquáticos vem atraindo atenção global nos últimos anos, devido sua potencial toxicidade, bioacumulação e biomagnificação trófica (Chen et al. 2016; Moura et al. 2018). A presença de metais ocorre de forma natural no ambiente. Todavia, quando oriundos das atividades antrópicas, maiores são os riscos de provocarem danos ao ecossistema, pois podem ser disponibilizados para os organismos em grandes quantidades em um curto período de tempo (Abreu et al. 2016). Apesar de alguns metais como cobre, zinco, ferro, cobalto, manganês serem essenciais e estarem envolvidos nos processos metabólicos e enzimáticos de diversos organismos, altas concentrações podem ocasionar efeitos deletérios na biota local, afluindo comunidades bentônicas, acarretar malformações em diversos organismos e por consequência reduzir a biodiversidade em uma determinada região (Lemos et al. 2013; de Carvalho Aguiar et al. 2016; Moura et al. 2018). No entanto, outros elementos químicos considerados não

essenciais como mercúrio (Hg), chumbo (Pb) e alumínio (Al) são disponibilizados no ambiente, principalmente por atividade antrópica. Por não possuírem função biológica, podem ser a causa e/ou origem de graves efeitos nocivos à saúde animal e humana, como degeneração neurológica e doenças cardiovasculares (Kehrig et al. 2010; Zhou et al. 2019).

O biomonitoramento de ecossistemas aquáticos é primordial para mensurar, avaliar e/ou acompanhar, por exemplo, uma poluição por elementos tóxicos refletindo a qualidade de um determinado ambiente, assim como suas alterações espaciais e temporais. Desta forma, diversos organismos como moluscos, aves, anfíbios, mamíferos e peixes podem exercer esta função (Zhou et al. 2008; Stolyar et al., 2008; Authman et al., 2015). Entretanto, segundo a revisão de Buron et al. (2009), com os estudos de Sures et al. (1994 a-c), Sures e Taraschewski (1995) e Zimmerman et al. (1999) foram estabelecidas novas possibilidades de pesquisa, ao comprovar a capacidade dos helmintos em atuar como potenciais bioindicadores de impacto ambiental. Sures et al. (1994) ao comparar a concentração de chumbo no acantocéfalo *Pomphorhynchus laevis* com musculatura, fígado e intestino do peixe hospedeiro demonstraram que o parasito obteve um nível 284 vezes superior ao encontrado no intestino, 771 vezes superior ao do fígado e 2.700 vezes superior ao da musculatura.

A aptidão para bioacumulação foi testada também em outros grupos de helmintos como nos cestóides (Sures et al. 1997a; Barus et al. 2003), nematóides (Barus et al. 2003; Tellez e Merchant 2015; Leite et al. 2016) e trematóides digenéticos (Morais e Malta 2014; Tellez e Merchant 2015). Contudo, a capacidade de bioacumular elementos traço pode variar entre os grupos de helmintos por depender de fatores como, por exemplo, natureza do metal, a idade e mobilidade do hospedeiro, a idade, estágio de desenvolvimento, sexo e sítio de infecção do parasito (Buron et al. 2009). Todavia, os acantocéfalos demonstram possuir maior capacidade de acumulação em relação aos moluscos (Sures et al. 1997b) e peixes (Thielen et al. 2004; Nachev e Sures 2016) de atuar como sentinelas para avaliação de contaminação do ecossistema aquático. Em uma recente revisão feita por Sures et al. (2017), os autores salientaram a alta capacidade dos acantocéfalos em acumular elementos químicos potencialmente tóxicos em maiores magnitudes do que seu hospedeiro e reforçam a importância de incluí-los em estudos para monitoramento ambiental.

1.1 Filo Acanthocephala

Acanthocephala Rudolphi, 1808 é um dos menores grupos dentre os metazoários parasitos, composto por pouco mais de 1.000 espécies descritas (Verweyen et al. 2011; Santos et al. 2013). Entretanto, o número de espécies pode estar subestimado (Pereira Jr e da Silva 2017), visto que a aplicação da biologia molecular e estudos filogenéticos têm descoberto novas espécies (Amin 2013). Kennedy (2006) ressaltou a pouca importância dada ao estudo deste filo pelos parasitologistas considerando-se que poucos livros didáticos abordam o tema ou o fazem de forma superficial, se referindo exclusivamente a sua posição sistemática.

1.1.1 Classificação Taxonômica

Segundo Amin (1985), o primeiro relato de um verme que possuía uma probóscida foi feita por Redi (1684), sendo Koelreuther (1771) provavelmente o primeiro autor a observar que os acantocéfalos eram um grupo distinto, nomeando-os de “Acanthocephali”. Rudolphi (1808) renomeou-o como Acanthocephala (grego: *akantho* = espinho; *kephala* = cabeça), entretanto somente com estudo de Van Cleave (1948) foi reconhecido como Filo, pois durante muito tempo, se encontravam incluídos entre os nematelmintos e cestóides por estes organismos possuírem características anatômicas similares (Yamaguti 1963; Pessoa e Martins 1982; Amin 1998).

A classificação dos taxonômica atual dos acantocéfalos incorporou características morfológicas, moleculares, filogenéticas, ecológicas e a distribuição dos hospedeiros (Amin 1987, 1998, 2013; Santos et al. 2013). Apesar da filogenia dos acantocéfalos ainda ser incerta (Pereira Jr e da Silva 2017), o grupo está dividido em quatro classes: Archiacanthocephala, Eoacanthocephala, Palaeacanthocephala e Polyacanthocephala.

A classe Archiacanthocephala Meyer, 1931, compreende indivíduos que parasitam aves e mamíferos. Nesta se incluem quatro ordens: Apororhynchida, Giganthorhynchida, Moniliformida e Oligacanthorhynchida, quatro famílias, 18 gêneros e 189 espécies.

A classe Eoacanthocephala Van Cleave, 1936, inclui espécies que possuem peixes como hospedeiros definitivos e menos frequentemente aqueles que parasitam anfíbios e répteis. Nesta são inclusas duas ordens: Gyraacanthocephala e Neoechinorhynchida, quatro famílias, 29 gêneros e 255 espécies.

A maior e mais diversificada é a classe Palaeacanthocephala Meyer, 1931. Compreende os acantocéfalos parasitos de peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Possui duas ordens: Echinorhynchida onde se encontram espécies que predominantemente parasitam peixes e ocasionalmente anfíbios e répteis e a Polymorphida onde se encontram espécies que predominantemente parasitam anfíbios, répteis, aves e mamíferos. No total, estão inclusas 16 famílias, 106 gêneros e 845 espécies.

A classe Polyacanthocephala Amin, 1987, inclui acantocéfalos parasitos de peixes e de Crocodilia. Possui apenas uma ordem: Polyacanthorhynchida, uma família, um gênero e quatro espécies.

1.1.2 *Biologia e ciclo biológico*

Os acantocéfalos são parasitos obrigatórios referidos em ecossistemas terrestres ou aquáticos em todos os continentes e apresentam uma certa uniformidade em sua morfologia, estádios larvais e ciclos de vida (Kennedy 2006; Santos et al. 2013). Os adultos habitam sempre o intestino de seus hospedeiros definitivos, geralmente um vertebrado, como peixes, aves e mamíferos enquanto as formas larvais utilizam um artrópode como hospedeiro intermediário, sendo insetos (Coleoptera, Orthoptera) para aqueles com ciclo biológico terrestre e crustáceos (Amphipoda, Copepoda, Isopoda, Ostracoda) para aqueles com ciclo aquático (Salgado Maldonado e Amin 2009).

No intestino do hospedeiro definitivo ocorre a cópula entre os acantocéfalos machos e fêmeas. Os ovos são formados e permanecem até completar seu desenvolvimento embrionário no interior do tronco da fêmea. Os ovos maduros possuem quatro membranas e uma forma larvar no seu interior denominada de acântor, o qual é bem caracterizado por possuir ganchos. Os ovos maduros são liberados gradualmente pela fêmea, misturam-se com as fezes do hospedeiro definitivo e alcançam o ambiente, contaminando-o. O hospedeiro intermediário ao se alimentar, se infecta de forma passiva ao ingerir o ovo junto com alimento e água (Pessoa e Martins 1982). No interior do sistema digestório do hospedeiro intermediário, o acântor auxiliado pelos seus ganchos, rompe os quatro envoltórios do ovo, torna-se ativamente móvel, penetra na parede intestinal do artrópode e aloja-se na hemocele, onde ocorre uma muda para o estágio conhecido como acantela. Caso o artrópode não seja um hospedeiro intermediário apropriado para a espécie de acantocéfalo, o acântor não é capaz de eclodir do ovo, desta forma passa a ser

eliminado com as fezes do artrópode. Outra possibilidade é que o acantor não consiga penetrar na parede intestinal para continuar seu desenvolvimento na hemocele e, neste caso, acaba por ser eliminado por consequência da reação inflamatória/imunológica do hospedeiro (Kennedy 2006). Assim que a fase de acantela alcança seu desenvolvimento completo, com formação total da probóscida e aparelho reprodutor, ocorre o início do encistamento, estágio conhecido como cistacanto. No momento em que o hospedeiro definitivo ingere o hospedeiro intermediário, o cistacanto, forma jovem imatura, alcança o intestino, onde irá se fixar e atingir maturidade sexual (Santos et al. 2013; Mathison et al. 2016) (Fig. 1).

Peixes, anfíbios e répteis podem atuar como hospedeiros paratênicos/transporte dependendo da espécie de acantocéfalo envolvida. Caso o cistacanto seja ingerido por um hospedeiro vertebrado não apropriado, para uma determinada espécie de acantocéfalo, o mesmo permanecerá sem sofrer nenhum desenvolvimento (Yamaguti 1963). Além disso, os hospedeiros paratênicos servem como importantes alternativas para o parasito alcançar seu hospedeiro apropriado (Kennedy 2006; Santos et al. 2013) (Fig. 1).

A grande maioria das espécies que compõe o filo Acanthocephala não se desenvolve em humanos já que muitos destes organismos quando ainda jovens não completam sua maturação sexual e/ou raramente produzem ovos. Entretanto, apesar de ser raro, espécies do gênero *Macracanthorhynchus* e *Moniliformis* são responsáveis pela grande maioria das infecções humanas (Mathison et al. 2016). Ingerir insetos na dieta mostrou ser fator condicionante para infecção humana, o que torna crianças mais susceptíveis. Esta prática mostrou ser antiga, como referido por Gonçalves et al. (2003) ao indicar ovos de acantocéfalos em fezes humanas antigas com uma abordagem paleoparasitológica.

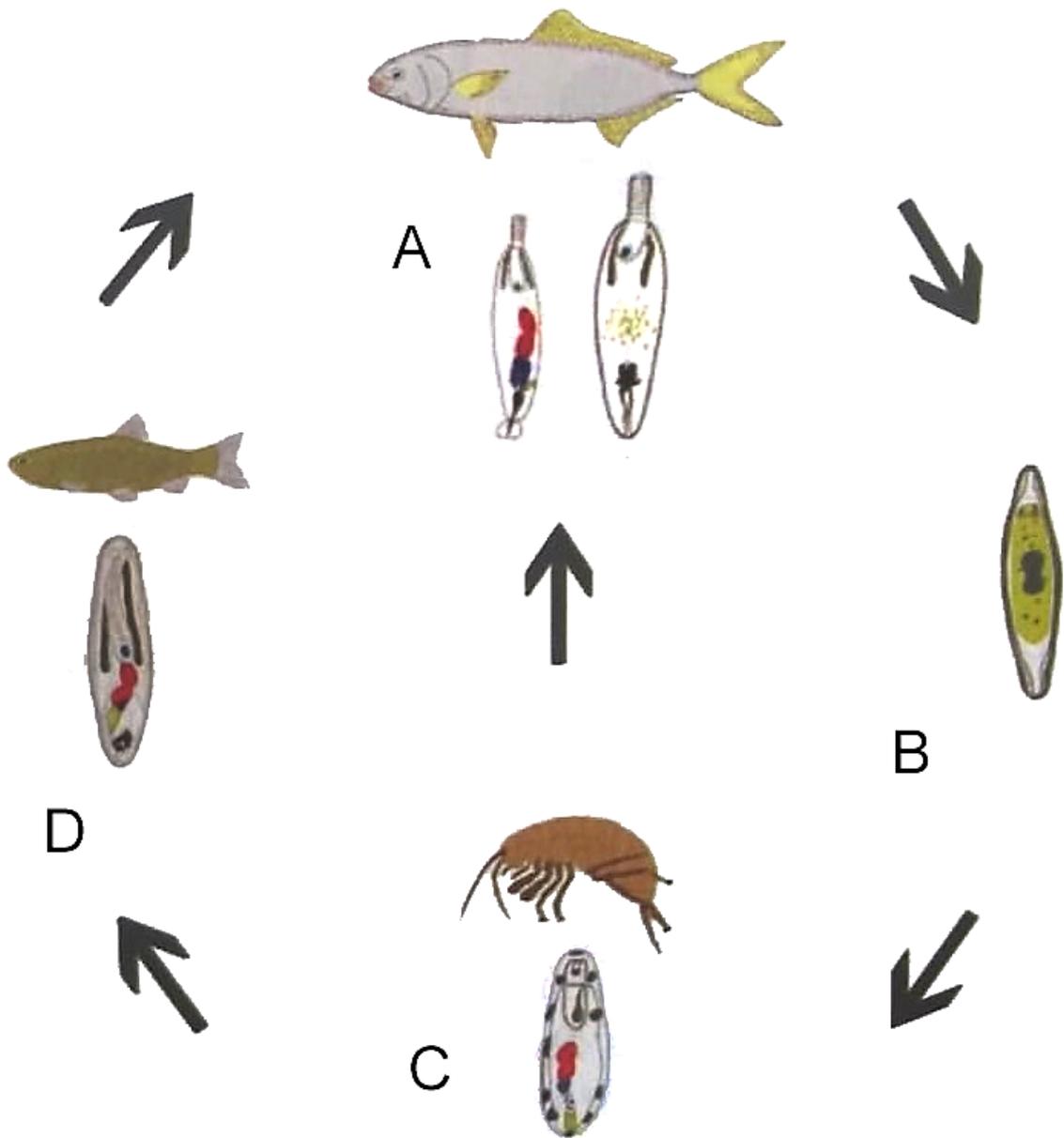


Figura 1 Ciclo biológico de um acantocéfalo: (A) Parasitos machos e fêmeas no interior do hospedeiro definitivo. (B) Ovo com larva acantor no seu interior eliminado junto com as fezes do seu hospedeiro definitivo. (C) Artrópode, hospedeiro intermediário infectado com larva acantela. (D) Hospedeiro paratênico/transporte contendo a larva cistacanto. Adaptado de Santos et al. (2013).

1.1.3 Morfologia do helminto adulto

Os acantocéfalos se caracterizam por possuírem na região anterior uma probóscida eversível com ganchos que auxiliam sua fixação no intestino de seu hospedeiro. O tronco pode estar ou não armado de espinhos e assim atuar como uma segunda estrutura com função de fixação (Van Cleave e Bullock 1950). Estes parasitos apresentam usualmente cor esbranquiçada a creme, porém podem ser encontradas espécies com coloração amarelada a alaranjada (Yamaguti 1963). Os acantocéfalos são pseudocelomados com simetria bilateral, não possuem tubo digestório e apresentam uma redução dos sistemas muscular, nervoso, circulatório e excretor, o que dificulta a diferenciação das espécies pela morfologia. Devido a ausência de sistema digestório, sua nutrição é feita por meio do tegumento que absorve os nutrientes necessários diretamente do conteúdo intestinal de seus hospedeiros (Amin 1998; Kennedy 2006; Pereira Jr e da Silva 2017).

O corpo dos acantocéfalos é cilíndrico, com tamanhos variados, porém a maioria das espécies não ultrapassa 10 mm de comprimento (apesar de algumas chegarem a 700 mm) (Miller e Dunagan 1985). Estruturalmente, está dividido em presoma (região anterior) e metasoma (região posterior) (Fig. 2). No presoma se encontram a probóscida com ganchos, pescoço, receptáculo da probóscida e lemniscos (Fig. 3). O metasoma compreende o tronco e onde estão localizados os órgãos reprodutores.

A probóscida pode ser curta, globosa ou cilíndrica e ornamentada com muitos ou poucos ganchos. Van Cleave (1941) estabeleceu que nas espécies que apresentam probóscida longa os ganchos devem ser contados de forma longitudinal e aquelas que possuem probóscida curta ou globosa, os ganchos devem ser contados em linhas espirais. Algumas diferenças no número de ganchos podem também acontecer entre os sexos de uma mesma espécie. Além disto, algumas espécies possuem ganchos ventrais mais desenvolvidos do que os ganchos dorsais (Yamaguti 1963). Estas estruturas têm um alto valor taxonômico para determinação das espécies.

O pescoço pode apresentar variações e em algumas espécies ser encontrado completamente reduzido. Em geral, esta região não apresenta espinhos ou ganchos (Yamaguti 1963).

Outras estruturas com importantes funções fisiológicas, mas também utilizadas para fins taxonômicos são o receptáculo ou bainha da probóscida e duas estruturas tubulares denominadas lemniscos, cujas funções estão relacionadas com a

invaginação e eversão da probóscida por diferença de pressão de fluidos (Santos et al. 2013; Pereira Jr e da Silva 2017).

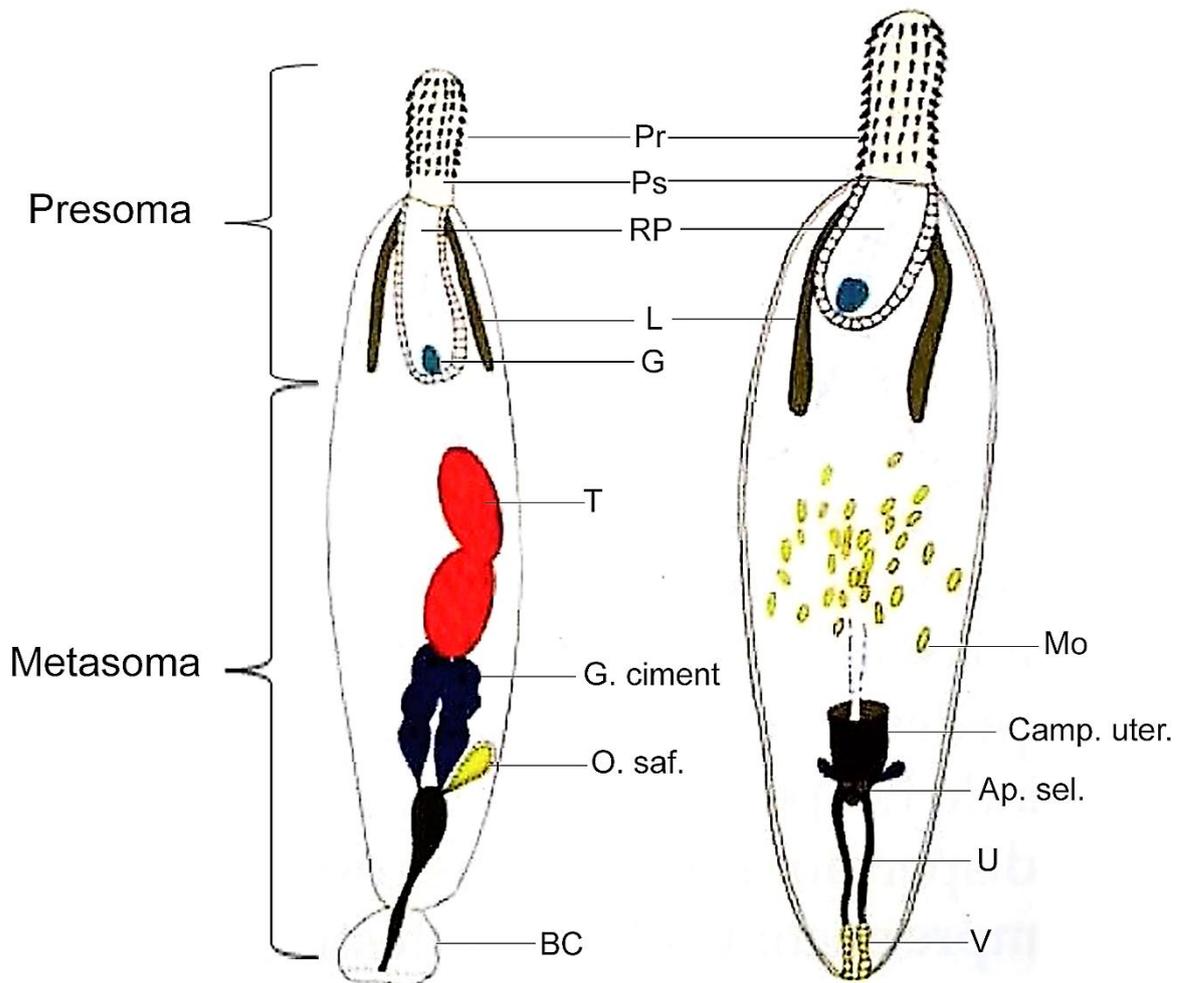


Figura 2 Divisão do corpo dos acantocéfalos adultos com a região anterior ou presoma onde se localizam a probóscida (Pr), pescoço (Ps), receptáculo da probóscida (RP), gânglio nervoso (G) e leminiscos (L) e a região posterior ou metasoma com os órgãos reprodutores: T = testículo; G. ciment = glândulas de cimento; O. saf. = órgão de Saeftingen; BC = bolsa copuladora; Mo = massas ovíferas; Camp. Uter. = campânula uterina; Ap. sel. = aparelho seletor de ovos; U = útero; V = vagina. Adaptado de Santos et al. (2013).

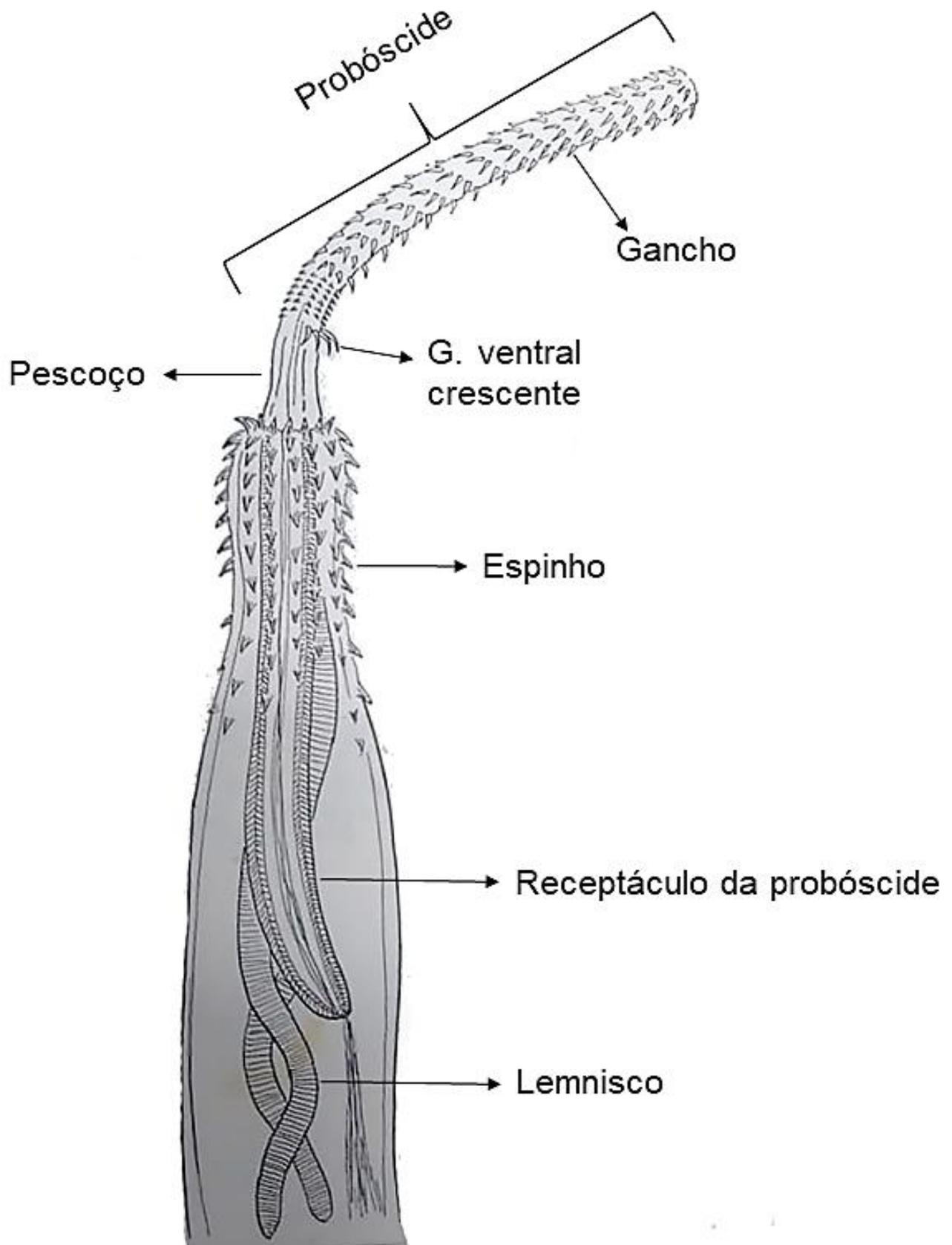


Figura 3 Presoma de *Dollfusentis chandleri*. Esquema mostrando as estruturas localizadas no presoma. Modificado de Golvan (1969).

Os acantocéfalos são dioicos, apresentam apenas um dos órgãos reprodutores, e as fêmeas são maiores do que os machos. Os aparelhos reprodutores são sustentados no pseudoceloma por meio de ligamentos que saem da base do receptáculo da probóscida até próximo ao poro genital. O aparelho reprodutor masculino consiste em geral de dois testículos de forma variada, canais eferentes e deferentes, vesícula seminal, glândulas de cimento, bolsa de Saefftingen, cirro ou penis e bolsa copuladora (Fig. 4) (Yamaguti 1963; Miller e Dunagan 1985;). As glândulas de cimento têm número e formas variadas e produzem uma substância tamponante para o poro genital das fêmeas após acasalamento. Esta substância pode ser inclusive utilizada entre os machos como forma de competição (Abele e Gilchrist 1977). A bolsa de Saefftingen é volumosa, piriforme e atua como uma bomba hidráulica para promover a invaginação e evaginação da bolsa copuladora (Golvan 1969) (Fig. 4).

O aparelho reprodutor feminino consiste em gônadas (que se fragmentam durante o amadurecimento formando massas ovíferas), campânula uterina, aparelho seletor de ovos, útero, vagina e poro genital feminino (Golvan 1969) (Fig. 4). Após a fecundação no pseudoceloma os ovos passam pela campânula e pelo aparelho seletor de ovos, o qual apenas permitirá a liberação dos ovos que alcançarem desenvolvimento completo (Kennedy 2006).

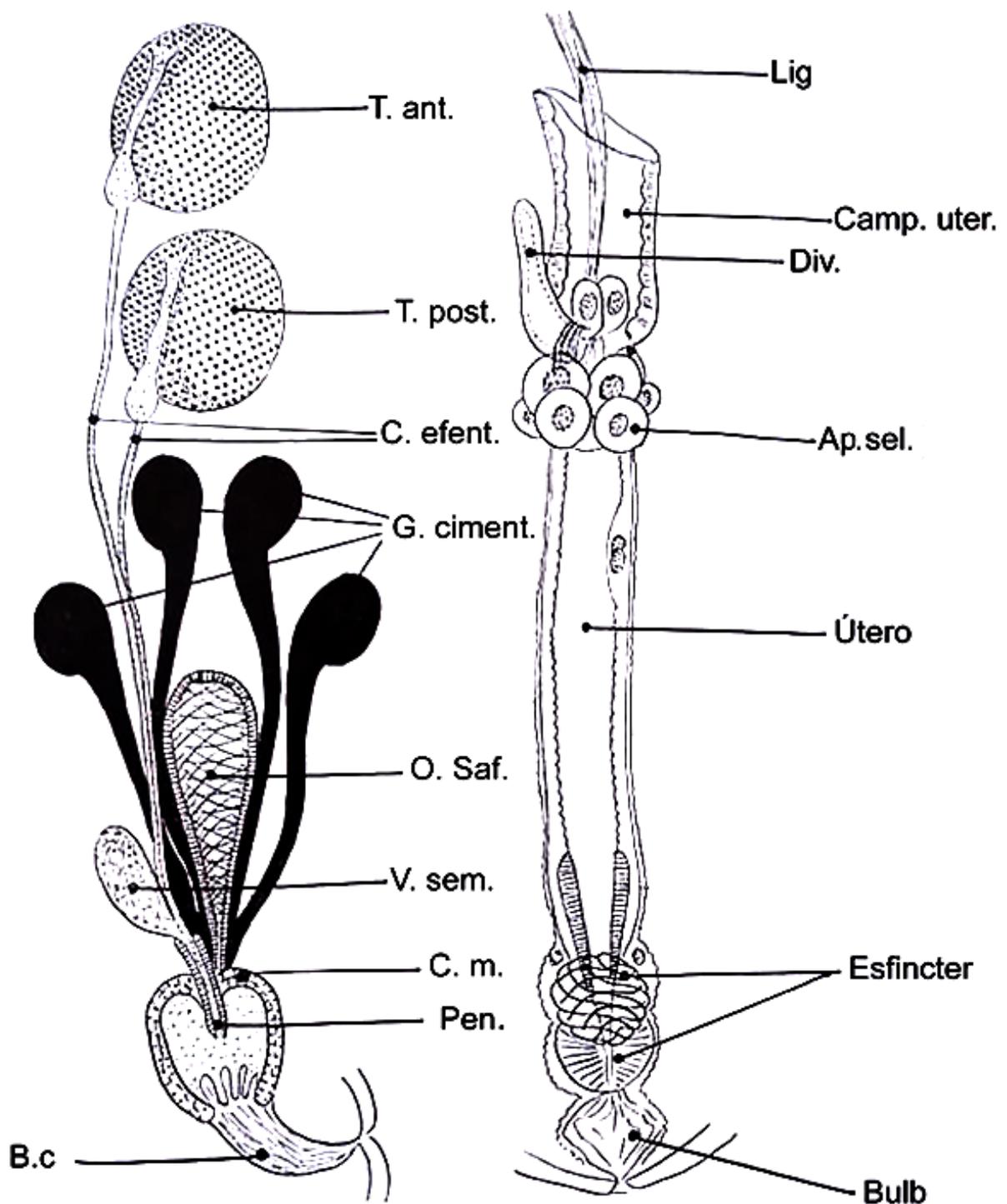


Figura 4 Sistema Reprodutor de Palaeacanthocephala. T. ant = testículo anterior; T. post = testículo posterior; C. efent.= canais eferentes; G. ciment = glândulas de cimento; O. Saf.= órgão de Saefftingen; V. sem.= vesícula seminal; C.m.= camada muscular da bolsa copuladora; Pen = pênis; Bc = parte membranosa da Bolsa copuladora; Lig = ligamento; Camp. uter.= campanula uterina; Div = divertículo; Ap. sel.= aparelho seletor; Útero; Esfíncter vaginal interno e externo; Bulb= bulbo vaginal. Modificado de Golvan (1969).

1.2 *Orthopristis ruber*

O peixe *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1830) (Fig. 5) pertence à família Haemulidae, onde os indivíduos são popularmente conhecidos como cocorocas. Estes organismos possuem habilidade de vocalizar um som característico quando submetidos a uma situação de estresse (Bertucci et al. 2014).



Figura 5 Espécime adulto de *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1830).

O. ruber está distribuído na faixa ocidental do Atlântico ao longo de todo o litoral brasileiro (Froese e Pauly 2018). Habitam desde águas rasas litorâneas até grandes profundidades (200 metros) sobre fundos rochosos, lamacentos, arenosos e/ou vegetação de algas, sendo mais comuns em águas salobras dos estuários. Sua alimentação envolve principalmente crustáceos, pequenos peixes, poliquetas e moluscos (Szpilman, 2000; Bashirullah e Diaz 2008).

Este peixe possui uma carne considerada de baixa qualidade para consumo humano, desta forma atrai pouco interesse comercial ou esportivo. Entretanto, são facilmente capturados por pescadores e bastante consumidos por população local de baixa renda (Szpilman, 2000).

1.2.1 *Acantocéfalos de Orthopristis ruber*

Santos et al. (2008) organizaram um “checklist” dos acantocéfalos associados a peixes marinhos e de água doce, com uma lista de parasitos e hospedeiros. Os acantocéfalos referidos em *O. ruber* no Brasil incluíram apenas duas espécies sendo a maior prevalência de *Dollfusentis chandleri* Golvan, 1969. Entretanto, há cinco espécies de *Dollfusentis* distribuídas ao longo da costa Atlântica das Américas que foram descritas apenas com base em dados morfológicos (Monks et al. 2008). As

espécies são muito semelhantes e não há informações sobre os perfis ultraestruturais e genético.

Atualmente uma abordagem integrativa vem sendo preconizada em estudos taxonômicos. O termo “Taxonomia Integrativa” foi proposto em 2005, como uma forma de abordar diferentes metodologias e fontes de dados disponíveis, pela necessidade de tratar com mais robustez critérios de delimitação e descrição de espécies (Dayrat 2005; Will et al. 2005).

1.3 Microanálise de elementos químicos por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

O método de microanálise da composição de elementos químicos utilizando a espectroscopia de energia dispersiva de raios-x (EDS) pode ser uma ferramenta útil para investigar a presença de elementos contaminantes devido a sua alta sensibilidade. É uma técnica versátil, pouco destrutiva, o que permite múltiplas observações em uma mesma amostra, requer um mínimo de preparação, permite analisar material de tamanho/peso reduzidos, possibilita detectar, localizar e semiquantificar elementos químicos em pequenas áreas e também permite realizar em conjunto estudos morfológicos ultraestruturais por estar associada a microscopia eletrônica (Scimeca et al. 2018).

A microanálise por EDS é baseada na geração de raios X característicos de cada elemento após interação com um feixe de elétron com uma determinada amostra. Quando o feixe de elétrons em um microscópio eletrônico atinge a amostra, alguns átomos da amostra são excitados. Desta forma, após retornar ao seu estado fundamental, eles emitem raios x característicos. Esses raios X são também característicos para o elemento do qual eles se originam. Um detector sensível à energia de fótons pode então medir esta emissão de raios X em diferentes comprimentos de onda (Scimeca et al. 2014). A coleta de raios x durante qualquer período de análise e sua energia são reproduzidos como um espectro. O espectro contém informação semiquantitativa quanto semiquantitativa. Para análise qualitativa, ou seja, identificação de elementos no espectro, é necessário a utilização de um *software* específico. Deste modo, a posição de um pico no espectro e sua energia, possibilita identificar o elemento (Scimeca et al. 2014; Scimeca et al. 2018).

Apesar do crescente número de dados sobre metais traço na Baía de Guanabara (Soares-Gomes et al. 2010; Abreu et al. 2016; de Carvalho Aguiar et al.

2018), de *O. ruber* ser um peixe frequentemente consumido pela população local e ter sido utilizado em testes de bioacumulação de mercúrio por Kehrig et al. (2010, 2011), a literatura ainda é escassa quanto a sua presença em parasitos de peixes na região estudada. Assim o uso de uma microanálise de raio-x poderá ser útil para uma avaliação comparativa da presença de elementos traço nos acantocéfalos e peixes hospedeiros na Baía de Guanabara.

1.4 Justificativa

Dollfusentis chandleri está distribuído do Golfo do México ao Brasil, e apresenta, junto com as outras espécies do gênero, descrições morfológicas não bem definidas e sobrepostas que precisam ser reavaliadas. É necessário um estudo de taxonomia integrativa, visto que não há até o momento dados ultraestruturais, genéticos e filogenéticos do grupo. Diferenças morfológicas e moleculares entre os espécimes podem indicar que *D. chandleri* represente um complexo de espécies.

Tendo em vista que *O. ruber* é comumente encontrado na Baía de Guanabara e que os acantocéfalos possuem alta capacidade de bioacumulação, uma comparação dos elementos traço presentes nos peixes e acantocéfalos possibilitará uma avaliação destes parasitos como potencial sentinela ambiental na região.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo taxonômico integrativo em acantocéfalos coletados de *Orthopristis ruber* da Baía de Guanabara e avaliar a presença de elementos traço nos parasitos e tecidos do hospedeiro.

2.2 Objetivos Específicos

Identificar as espécies de acantocéfalos por meio de estudos morfológicos, ultraestruturais e moleculares;

Analisar elementos traço presentes nos acantocéfalos;

Analisar elementos traço presentes na musculatura, fígado e brânquias de *O. ruber*;

Comparar os elementos traço entre os acantocéfalos e os tecidos do hospedeiro;

Avaliar o potencial dos acantocéfalos de *O. ruber* como sentinelas para monitoramento ambiental na região;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Hospedeiro

No período de 2015-2018, 109 espécimes de *O. ruber* foram coletados na região da Urca, Rio de Janeiro (22°56'40.0"S 43°09'46.8"W) e transportados em gelo para o Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz na Fiocruz-Rio de Janeiro (LAPSA, IOC/Fiocruz- RJ). A coleta e a utilização dos peixes foram licenciadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – SISBIO Licença Permanente nº 15898-1) de acordo com normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os peixes foram medidos, pesados e identificados de acordo com Menezes e Figueiredo (1980). Após a necropsia dos animais, suas vísceras foram separadas individualmente em placas de Petri com solução fisiológica 0,7% e analisadas com auxílio de um microscópio estereoscópio Olympus SZ61 para pesquisa e coleta dos acantocéfalos.

Para fins comparativos, 25 exemplares do peixe *Eugerres plumieri* Cuvier, 1830 foram coletados da Lagoa de Sontecomapan, Veracruz, México (18°31'45"N, 95°06'08"W) em fevereiro de 2018 por Gerardo Perez Ponce de Leon e Martin Garcia Varela da Universidade Nacional Autónoma do México (UNAM). Esta coleta foi feita na localidade tipo de onde a espécie *Dollfusentis bravoae* Salgado-Maldonado, 1976 foi descrita. Os procedimentos de coleta seguiram a Cartilla Nacional de Colector Científico (FAUT, 0202 e 0057) da Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) do México.

3.2 Parasitos

Os acantocéfalos coletados em *O. ruber* e *E. plumieri* foram lavados com solução fisiológica 0,7% e colocados a 4°C por até 24 horas para facilitar a evaginação da probóscida.

Os parasitos foram fixados alternativamente em álcool 70°, formaldeído 4% ou congelados. Para estudos moleculares, os parasitos foram cortados com auxílio de uma lâmina de bisturi estéril na região mediana do tronco e divididos em 3 partes, sendo a parte anterior e posterior fixados em álcool 70% para posterior identificação

morfológica e a parte mediana colocada em *ependorf* estéril e congelado a temperatura de -20°C.

3.3 Identificação Taxonômica

3.3.1 Morfologia e Morfometria

Os exemplares previamente fixados em álcool 70% foram corados pelo Paracarmin de Meyer por tempo variável até impregnação do corante, diferenciados em ácido clorídrico a 2 % para retirada do excesso de corante, desidratados em série alcoólica crescente (70%, 80%, 90%, 100%) por 30 minutos cada, diafanizados em concentrações crescentes de óleo de cravo (10%, 50% e 100%) por tempo variável e montados nas lâminas em bálsamo do Canadá. Alguns espécimes foram colocados diretamente em solução de Berlese para facilitar a observação e/ou contagem de estruturas esclerotizadas como os ganchos e espinhos.

Os indivíduos foram analisados com auxílio do microscópio LEICA DMLS2 e medidos com uma ocular micrométrica. As medidas são apresentadas em micrômetros com a média seguida da variação entre parênteses e o “n” amostral. Os desenhos foram realizados com auxílio de câmera clara acomodada ao microscópio e redesenhados em mesa digitalizadora com auxílio do programa Inkscape 0.92. Os espécimes do México também foram processados visando análise morfológica e molecular para serem comparados com o material do Brasil.

Espécimes de *D. chandleri* previamente depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC) sob os números 31981, 31982 (A-G), 32194, 32195, 32196, 32198, 32199 (A-B), 32204 e 34022 foram reexaminados para fins comparativos. O material depositado na Colección Nacional de Helmitos, México (CNHE) de espécimes de *D. chandleri* números 673, 664, 665, 5719; *D. bravoae* 649 (Holótipo) e *D. salgadoi* Monks, Alemán-García e Pulido-Flores, 2008 6267 (Holótipo), 6268, 6269 foram também estudados.

3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os acantocéfalos fixados em formaldeído 4% foram lavados em tampão cacodilato 0.1M, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio a 0,8% a temperatura ambiente e ausência de luz. Os espécimes foram desidratados em série alcóolica crescente (70%, 80%, 90%, 100%), por 30 minutos em cada etapa.

O material foi seco pela substituição do desidratante por CO₂ no aparelho de ponto crítico Tousimis Autosamdri 805. A seguir foram montados em suportes de alumínio em fita dupla face para serem metalizados no Cressington sputter coater 108 com aproximadamente uma camada de 20 nm de ouro e observados ao microscópio Jeol JSM 6390LV (Inc. USA, Peabody, MA), da Plataforma de Microscopia Eletrônica Ruldfolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

Dois espécimes de *D. bravoae* foram desidratados em série alcoólica, submetidos ao ponto crítico com CO₂, revestidos com ouro e examinados ao microscópio eletrônico de varredura Hitachi Stereoscan modelo SU1510 (Hitachi High-Technologies México S.A. de C.V., México) em 15 kV no Instituto de Biologia da UNAM.

3.3.3 Índices Ecológicos

Índices ecológicos do parasitismo como prevalência e intensidade de infecção foram avaliados segundo Bush et al. (1997), que resumidamente consiste de: prevalência é o número de hospedeiros infectados com um ou mais indivíduos de uma determinada espécie de parasito dividido pelo número de hospedeiros examinados para aquela determinada espécie de parasito. A intensidade de infecção consiste no número de indivíduos de um determinado parasito em um único hospedeiro infectado, ou seja, o número de indivíduos de uma infrapopulação.

3.3.4 Análise Molecular e Filogenética

Para realizar a extração do DNA de 8 acantocéfalos adultos do Brasil e 7 do México foi utilizado o kit QIAamp DNA Mini (Qiagen, Hilden, Germany) seguindo as recomendações do fabricante.

Para amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) da região 28S rDNA, utilizou-se os *primers* C1 (5'-ACCCGCTGAATTTAAGCAT-3') e D2 (5'-TGGTCCGTGTTTCAAGAC-3') (Hassouna et al. 1984). As regiões do ITS1, 5.8 e ITS2 foram amplificadas com os *primers* BD1 (5'GTCGTAACAAGGTTTCCGTA3') e BD2 (5'TATGCTTAARTTCAGCGGGT-3') (Luton et al., 1992). Para a região do 18S rDNA foram utilizados os *primers* (5'-AGATTAAGCCATGCATGCGTAAG-3') e (5'-TGA TCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3') (Garey et al. 1996). Para o citocromo c-oxidase (COI) mtDNA foram utilizados os *primers* LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HC02198 (5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (Folmer et al. 1994). Todas as reações

foram realizadas com um total de 15 µl, contendo 7.5 µl de 2 × GoTaq® Colorless Master Mix (Promega), 1.5 µl de cada primer com concentração final de 10 pMol e 2.0 µl de DNA da amostra e água ultrapura até completar o volume final. Os parâmetros de ciclagem para as regiões do 28S rDNA e ITS1. 5.8S e ITS2 seguiram o preconizado por Santos et al. (2016) e as regiões 18S rDNA e COI foram amplificadas segundo Irena et al. (2013).

Os produtos da PCR foram observados após eletroforese em gel de agarose 1.5% agarose em Tris-borate EDTA, corado com SyberGreen (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) e fotografados sobre um transiluminador ultravioleta. Os produtos da PCR foram purificados com ExoSAP-IT (Affymetrix, Cleveland, Ohio, USA).

Para sequenciamento foi utilizado o kit BigDye v.3.1 *chemistry* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) com os mesmos *primers* da PCR. Esse procedimento foi realizado no sequenciador ABI Prism 3730 da Plataforma de Sequenciamento da Fundação Oswaldo Cruz PDTIS/Fiocruz. As sequências nucleotídicas geradas foram editadas e alinhadas com o programa MEGA 7.0 (Kumar et al. 2016). As mesmas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank utilizando o programa BLAST do servidor do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul et al. 1990).

Com o objetivo de explorar as relações filogenéticas, as sequências de nucleotídeos foram alinhadas pelo algoritmo Clustal W (Thompson et al. 1994) presente no MEGA 7.0. As sequências de COI foram traduzidas para aminoácidos para checar a presença de códons de parada prematuros. Divergências genéticas entre sequências de COI foram determinadas utilizando o método *p-distance* no mesmo software. As árvores filogenéticas foram inferidas pelo método da Máxima Verossimilhança (ML) pelo programa RAxML v7.0.4 (Stamatakis 2006). O modelo GTRGAMMAI de substituição foi utilizado para as 3 regiões (18S, 28S e COI) com replicações de 10.000 bootstrap. As sequências utilizadas para construção das árvores estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 Acantocéfalos utilizados nas análises filogenéticas

Espécie	Família	18S rDNA	28S rDNA	COI mtDNA
<i>Acanthocephalus anguillae</i>	Echinorhynchidae	AF469413	-	-
<i>Acanthocephalus dirus</i>	Echinorhynchidae	AY830151	AY829106	DQ089718
<i>Acanthocephalus lucii</i>	Echinorhynchidae	AY830152	AY829101	-
<i>Acanthocephaloides propinquus</i>	Echinorhynchidae	AY830149	AY829100	-
<i>Dentitruncus truttae</i>	Illiosentidae	JX460863	-	-
<i>Dollfusentis</i> n. sp.	Illiosentidae	MK282744	MK282746	MK294053
		MK282745	MK282747	MK294054
			MK282748	MK294055
			MK282749	MK294056
			MK282750	MK294057
			MK282751	MK294058
			MK282752	MK294059
			MK282753	
<i>Dollfusentis bravoae</i>	Illiosentidae	MK282759	MK282754	MK294060
				MK294061
				MK294062
				MK294063
				MK294064
<i>Dollfusentis chandleri</i>	Illiosentidae	-	-	DQ320492
				DQ320493
				DQ320488
				DQ320486
				DQ320485
				DQ320489
				DQ320484
				DQ320490
				DQ320491
				DQ320487
<i>Echinorhynchus gadi</i>	Echinorhynchidae	JX014222	-	-
<i>Echinorhynchus truttae</i>	Echinorhynchidae		AY829097	DQ089710
<i>Filisoma bucerium</i>	Cavisomidae	AF064814	DQ089722	DQ089722
<i>Illiosentis</i> sp.	Illiosentidae	AY830158	AY829092	DQ089705
<i>Koronacantha mexicana</i>	Illiosentidae	AY830157	AY829095	DQ089708
<i>Koronacantha pectinaria</i>	Illiosentidae	AF092433	AY829094	DQ089707
<i>Leptorhynchoides thecatus</i>	Rhadinorhynchidae	AF001840	AY829093	DQ089706
<i>Pomphorhynchus bulbocolli</i>	Pomphorhynchidae	JX014222	AY829096	DQ089709
<i>Pomphorhynchus laevis</i>	Pomphorhynchidae	JX014223	-	-
<i>Pomphorhynchus zhoushanensis</i>	Pomphorhynchidae	KY490051	-	-
<i>Pseudoleptorhynchoides lamothei</i>	Rhadinorhynchidae	EU090950	-	EU090949
<i>Rhadinorhynchus</i> sp.	Rhadinorhynchidae		DQ089722	DQ089712
<i>Rhadinorhynchus pristis</i>	Rhadinorhynchidae	JX014226	-	-
<i>Serrasentis nadakali</i>	Rhadinorhynchidae	KC291715	-	-
<i>Transvena annulospinosa</i>	Transvenidae	-	AY829098	DQ089711

3.4 Elementos Traço

3.4.1 *Microanálise de elementos por Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)*

Quatro espécimes de *O. ruber* foram utilizados para análise de EDS sendo retirados aproximadamente 1 cm³ da musculatura, do fígado e das brânquias, que foram posteriormente congelados a -20°C. Os acantocéfalos coletados do intestino dos mesmos peixes foram lavados e mantidos *overnight* em temperatura de 4°C em solução salina 0,7% para promover relaxamento e reversão da probóscida. Posteriormente foram congelados a -20°C.

Para preparar as amostras para análise por MEV-EDS, os parasitos e tecidos dos peixes foram lavados em água destilada, fixados em álcool 70% e submetidos a desidratação em série alcoólica crescente (70%, 80%, 90%, 100%). Em seguida foram submetidos a secagem pelo método do ponto crítico com CO₂.

As amostras foram montadas em suportes de carbono, revestidos com fita dupla face de carbono e metalizadas com carbono. O material foi analisado ao microscópico eletrônico de varredura JEOL JSM 6390 LV (JEOL USA Inc., Peabody, MA, USA) acoplado a sonda de espectroscopia por energia dispersiva de raios x (Thermofisher) na Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz.

Os helmintos foram primeiramente analisados ao MEV para fins taxonômicos. Um teste inicial para análise pelo MEV-EDS foi realizado com um acantocéfalo para fins de padronização da técnica. A detecção dos elementos no parasito foi estabelecida em três pontos (“point and shooting”) de 11 acantocéfalos sendo um ponto na probóscida, um na região mediana do tronco e um na região posterior do tronco. A detecção dos elementos nos tecidos dos peixes foi estabelecida por pontos selecionados de forma aleatória, sendo três pontos em cada fígado, três em cada musculatura e três em cada brânquia.

Os elementos traço foram identificados após um tempo de análise/corrída de 100 segundos para cada ponto (análise qualitativa). Os resultados da análise semiquantitativa dos elementos traço foram expressos em porcentagem de peso (wt%), onde o peso medido de cada elemento é fornecido em percentual e a soma dos pesos de todos os elementos encontrados equivale a cem por cento.

Nas análises estatísticas foi utilizado o programa R (R Development Core Team, 2018). A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar as

diferenças entre: *w*^t% de cada elemento nas diferentes regiões do parasito (Probóscida X região mediana do tronco X região posterior do tronco); no tecido do peixe (fígado X musculatura X brânquias); e na comparação do *w*^t% dos elementos traço das diferentes regiões do parasito com os tecidos do peixe. Os valores foram transformados em $\log(x + 0.5)$ para alcançar uma distribuição Gaussiana.

A prevalência dos elementos em cada amostra foi calculada pelo total de amostras positivas divididas pelo número de amostras analisadas (resultados em porcentagem).

O teste do qui quadrado foi realizado para determinar as diferenças entre a prevalência de amostras positivas para cada elemento traço no parasito e no peixe.

Os elementos Carbono (C), Nitrogênio (N) e Oxigênio (O) comuns no protoplasma de *Acanthocephala* foram omitidos nas análises estatísticas.

4 RESULTADOS

4.1 Hospedeiros e Parasitos

Um total de 109 espécimes de *O. ruber* medindo 9–24 (17) cm foram coletados da região da praia da Urca, Rio de Janeiro, Brasil. Sessenta e nove exemplares foram encontrados parasitados por espécimes do gênero *Dollfusentis*. Após um detalhado estudo morfológico, concluímos que os indivíduos correspondiam a uma nova espécie de *Dollfusentis*. Vinte espécimes de *D. bravoae* coletados de 25 *E. plumieri* do México foram comparados com os exemplares coletados do RJ por meio de ultraestrutura e perfil genético.

4.2 *Dollfusentis* n. sp.

4.2.1.1 Descrição morfológica geral

Fêmeas maiores que os machos. Tronco cilíndrico e alongado com espinhos que se estendem da junção do pescoço até quase o final do receptáculo da probóscida. Distribuição similar dos espinhos do tronco em ambos os sexos. Espinhos anteriores maiores do que os posteriores. Probóscida longa, cilíndrica com 12–14 fileiras longitudinais contendo 16–17 ganchos. Os 3–4 ganchos finais de cada fileira são reduzidos de tamanho e apresentam um padrão vertical. Papila sensorial presente entre o 5–6 ou 6–7 gancho a partir dos ganchos verticais. Ganchos ventrolaterais crescentes em número de 8, espaçados dos ganchos posteriores da probóscida. Pequenos espinhos direcionados para a região anterior podem estar presentes na região posterior do tronco dos machos. Pescoço liso. Receptáculo da probóscida apresenta parede dupla. Há dois lemniscos alongados, com aspecto digitiforme sendo um ligeiramente menor do que o outro; os dois são maiores do que o receptáculo da probóscida.

4.2.1.2 Macho

Medidas baseadas em 16 espécimes: Tronco 4.783 (4.075–5.850, n=15) comprimento por 427 (375–500, n=15) de largura (Fig. 6A). Espinhos anteriores 66 (60–75, n=12) de comprimento e espinhos posteriores 16 (15–20, n=12) de comprimento (Fig. 6B e C). Probóscida 798 (625–1.000, n=12) de comprimento por

92 (75–125, n=16) de largura com 12–13 fileiras longitudinais de 16–17 ganchos (Fig. 6A e B). Ganchos apicais 48 (40–50, n=11) de comprimento, ganchos medianos 31 (25–35, n=13) de comprimento, ganchos basais verticais 16 (15–20, n= 13) de comprimento. Crescentes ventrais 45 (40–50, n=12) de comprimento, distando 25 (20–30, n=11) dos ganchos basais verticais. Pescoço 256 (200–300, n= 13) de comprimento por 104 (80–150 n= 14) de largura (Fig. 6B). Receptáculo da probóscida 1.241 (1.000–1.750, n= 14) de comprimento por 126 (100–200 n= 15) de largura. Lemnisco menor 1.755 (1.400–2.030, n= 9) de comprimento; lemnisco maior 2.088 (2.000–2.200, n= 10) de comprimento. Aparelho reprodutor masculino ocupa a terça parte do tronco. Testículos ovais, anterior 314 (250–400, n=13) de comprimento por 230 (180–290, n=13) de largura e o posterior 278 (200–340, n= 13) de comprimento por 225 (150–320, n=13) (Fig. 6A). Canais eferentes emergem da parte posterior de cada testículo. Vesícula seminal oval e alongada. As 8 glândulas de cimento são claviformes. Bolsa de Saeftigen piriforme 716 (600–850, n=9) de comprimento. Bolsa copuladora 325 (200–420, n=11) de comprimento por 285 (200–350, n=11) quando completamente evertida. Pequenos espinhos apontados para região anterior distribuídos de forma irregular na parte posterior do tronco dos machos.

4.2.1.3 Fêmea

Medidas baseadas em 18 espécimes: Tronco 6.800 (4.125–9.100, n= 9) de comprimento por 331 (250–400, n= 12) de largura (Fig. 6D). Espinhos anteriores 74 (63–85, n= 10) e espinhos posteriores 16 (15–20, n=11). Probóscida 965 (775–1.080, n= 7) de comprimento por 98 (75–125, n=12) de largura, albergando 12–14 fileiras longitudinais contendo 16–17 ganchos. Ganchos apicais 50 (45–55, n= 8) de comprimento. Ganchos médios 39 (30–45, n= 9) de comprimento. Ganchos basais verticais 17 (15–20, n= 9) de comprimento. Oito ganchos ventrolaterais crescentes 50 (45–60, n= 10) de comprimento com uma distância de 26 (20–40, n= 9) dos ganchos basais verticais da probóscida. Pescoço 303 (260–350, n= 8) de comprimento por 108 (90–140, n= 9). Receptáculo da probóscida 1.223 (1.050–1.390 n= 11) de comprimento por 150 (100–230 n= 8). Lemnisco menor 2.207 (2.000–2.370, n= 3) de comprimento e o maior 2.275 (2.010–2.600, n=4) de comprimento (Fig. 6D). Aparelho reprodutor feminino, da parte apical da campânula uterina até o final do tronco apresentou 890 (690–1.150, n= 4) de comprimento (Fig. 6E). Campânula uterina 338 (225–550, n= 7) de comprimento por 45 (40–50, n= 6). Útero 279 (225–325, n=6) de comprimento por 25 (20–30, n= 6). Poro genital terminal. Ovos maduros alongados

com prolongamentos polares medem 68 (63–75, n= 10) de comprimento por 15 (15–20, n=9) de largura (Fig. 6F).

4.2.2 Ultraestrutura

Probóscida alongada, cilíndrica, armada com 16-17 ganchos longitudinais. Pescoço liso. Tronco armado na região anterior (Fig. 7A e B). Ganchos da probóscida diminuem gradualmente de tamanho em direção aos ganchos basais verticais. Há clara separação entre os ganchos basais verticais e os ganchos ventrais crescentes (Fig. 7B e C). Tronco ligeiramente mais fino na porção anterior, armado com espinhos fortes que diminuem de tamanho e ficam mais esparsos (Fig. 7A e C). Bolsa copuladora dos machos em formato de sino. Pequenos espinhos apontados para região anterior podem estar presentes na porção posterior do tronco (Fig. 7F). Tronco das fêmeas termina de forma truncada. Poro genital feminino é terminal (Fig. 7E).

As micrografias de MEV de *Dolffusentis bravoae* proveniente do México (Fig. 8) mostram tronco armado com espinhos que diminuem gradativamente de tamanho. Algumas similaridades com a espécie do Brasil incluem uma probóscida armada de 16-17 ganchos por fileira longitudinal, pescoço inerme (Fig. 8A e B) e uma clara separação entre os ganchos basais da probóscida com os ganchos ventrais crescentes (Fig. 8C). Os machos possuem espinhos direcionados anteriormente na região posterior do tronco (Fig. 8D).

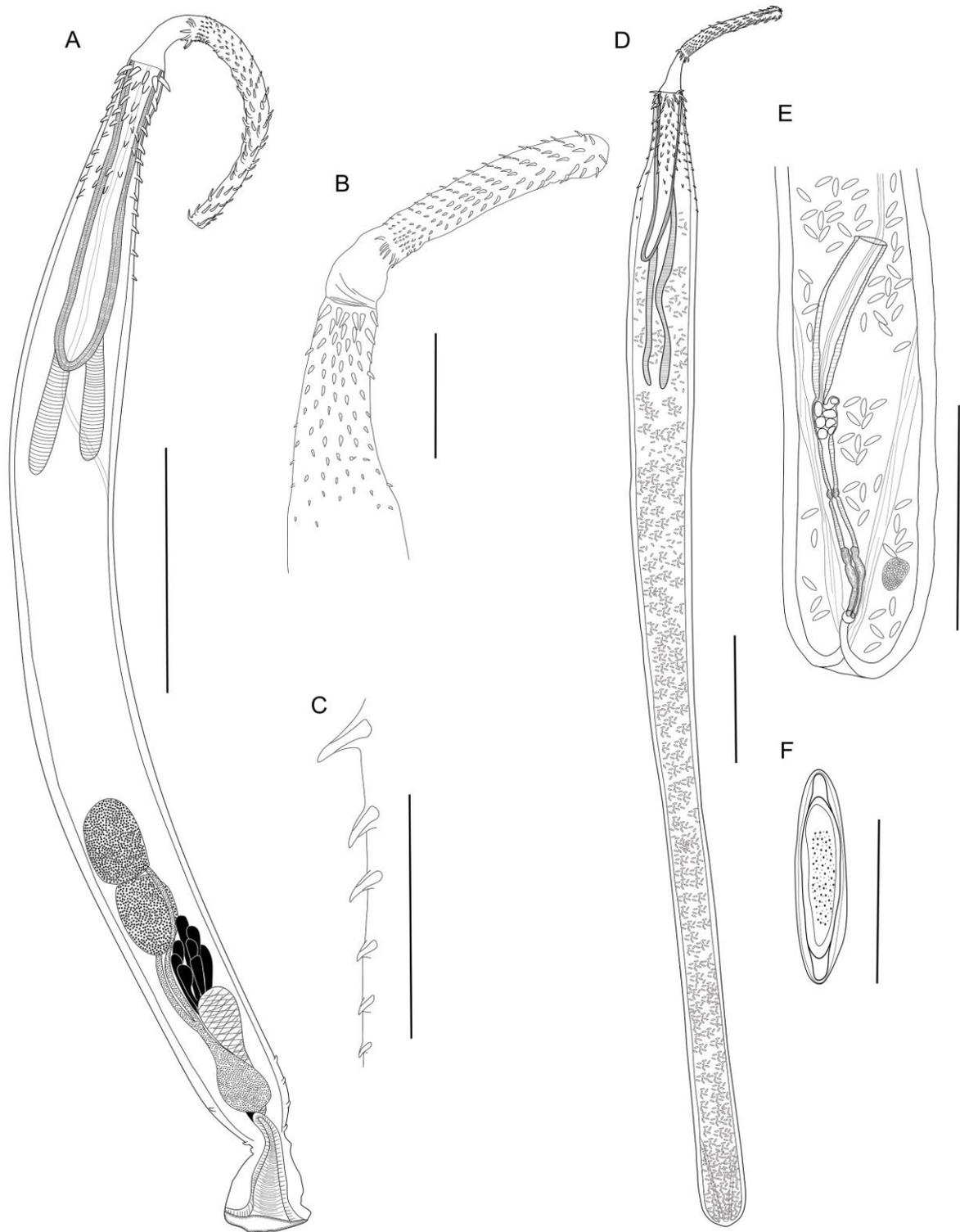


Figura 6 *Dollfusentis* n. sp. (A) Macho vista total, tronco com presença de espinhos na parte anterior, probóscida, receptáculo, leminiscos, testículos, glândulas de cimento, vesícula seminal, órgão de Saeftigen e bolsa copuladora evertida; (B) detalhe da região anterior com arranjo dos ganchos da probóscida e espinhos do tronco; (C) Diferentes tamanhos dos espinhos do tronco; (D) Fêmea, vista total; (E) Detalhe do aparelho reprodutor de uma fêmea; (F) Ovo. Barras: A = 1000 μ m; B = 500 μ m; C = 300 μ m; D = 1000 μ m; E = 500 μ m; 50 μ m.

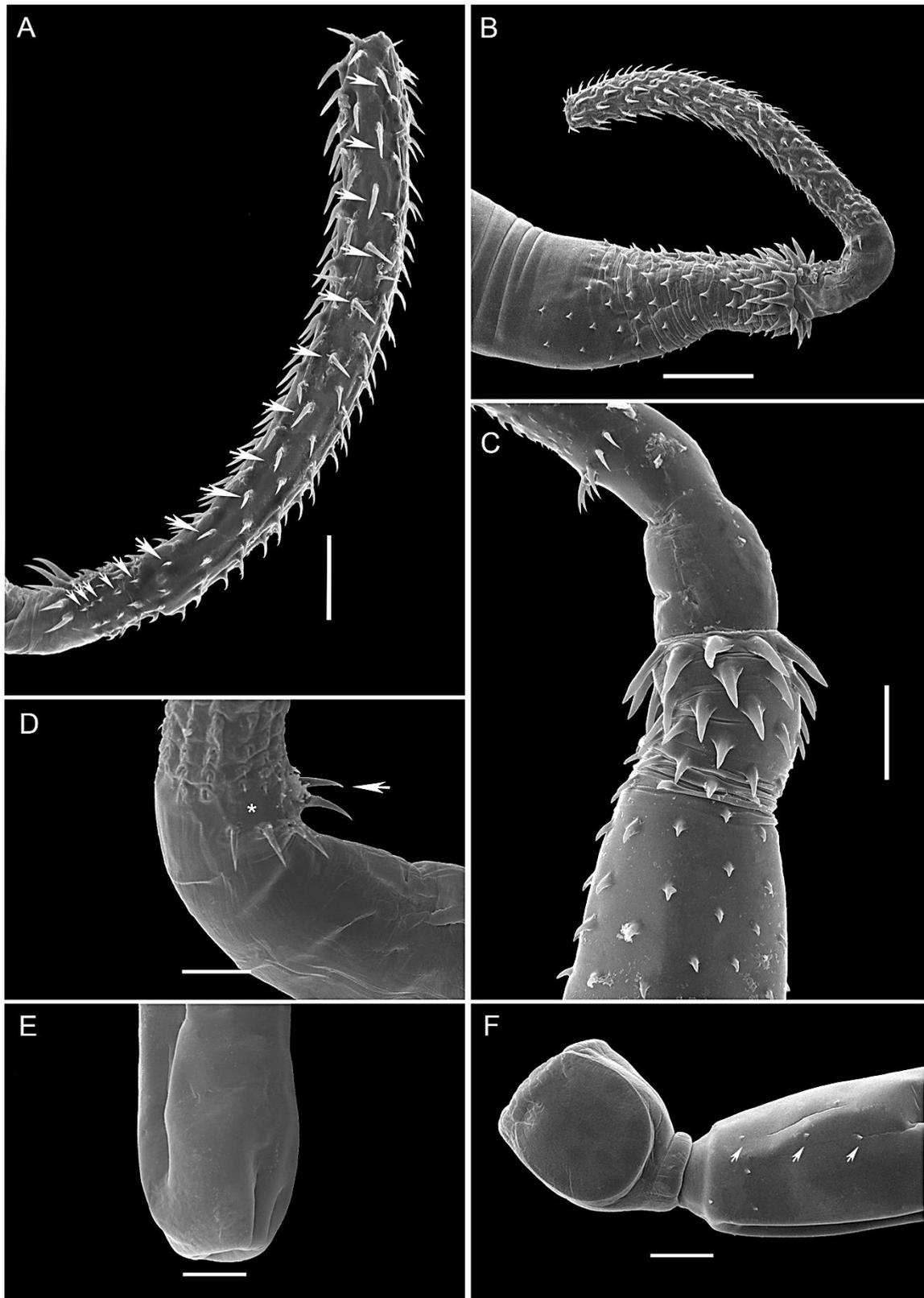


Figura 7 Microscopia eletrônica de varredura de *Dollfusentis* n. sp. (A) Probóscida com 16 ganchos (setas); (B) Probóscida, pescoço e tronco armado anteriormente com grandes espinhos anteriores reduzindo em tamanho; (C) ganchos ventrais crescentes, pescoço e espinhos anteriores do tronco; (D) gancho ventral crescente (seta) espaçado dos ganchos basais (asterisco) (E) porção posterior de uma fêmea; (F) bolsa copuladora evertida com espinhos na porção posterior do tronco e dirigidos para porção anterior. Barras: A = 100 μ m; B = 200 μ m; C = 100 μ m; D = 500 μ m; E-F = 100 μ m.

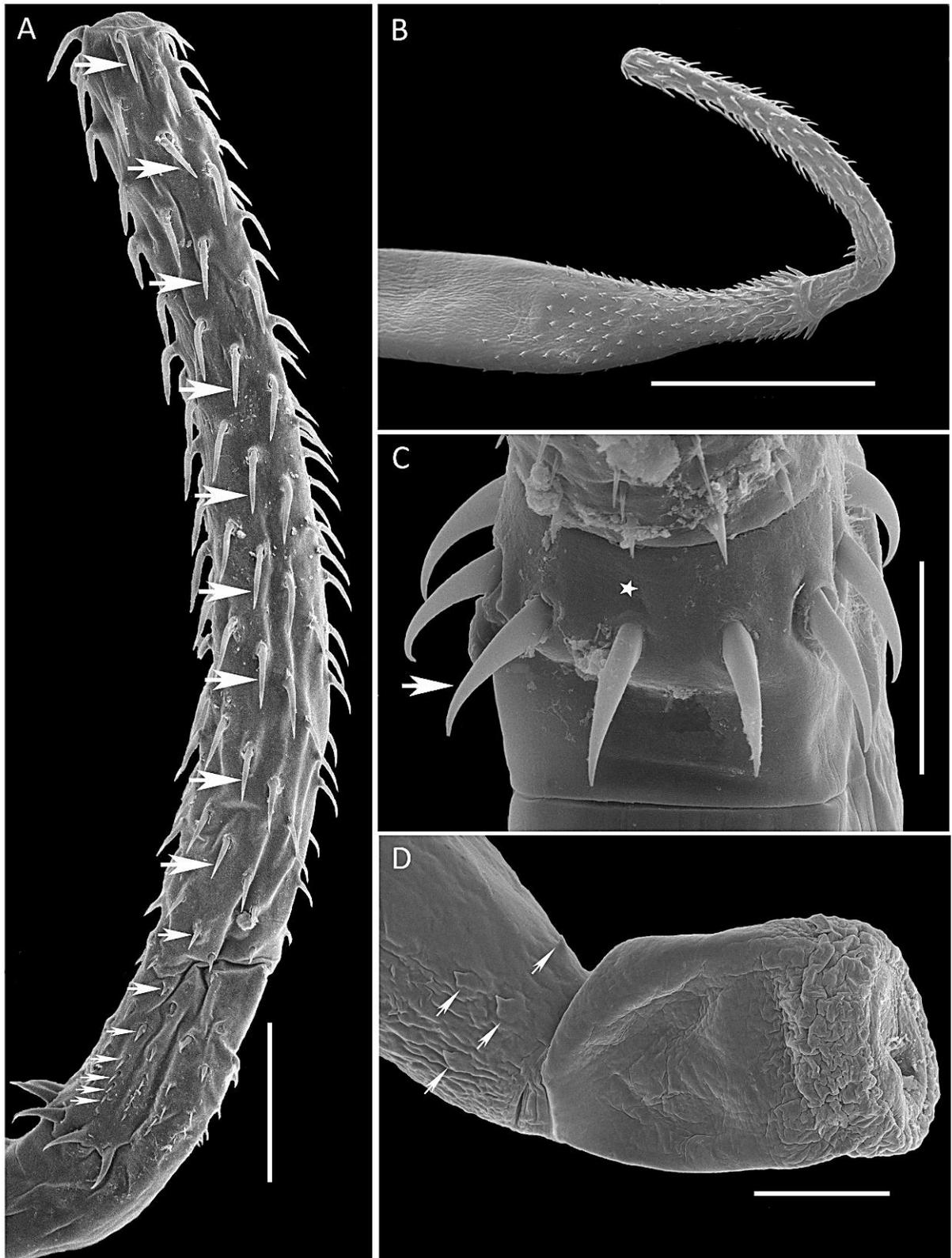


Figura 8 Microscopia eletrônica de varredura de *Dollfusentis bravoae*. (A) Probóscida com 16 ganchos (setas); (B) Probóscida, pescoço e tronco armado anteriormente; (C) ganchos ventrais crescentes (seta) espaçados dos ganchos basais da próscida (estrela); (D) porção posterior do tronco armado com espinhos direcionados para porção anterior e bolsa copuladora evertida. Barras: A = 100 μm ; B = 500 μm ; C = 40 μm ; D = 100 μm .

4.2.3 *Diagnose Diferencial*

Dollfusentis n. sp é a sexta espécie proposta para o gênero, que inclui *D. chandleri*, *D. bravoae*, *D. salgadoi*, *D. ctenorhynchus* (Cable e Linderoth 1963) e *D. longispinus* (Cable e Linderoth 1963).

Todas estas espécies possuem 12–14 fileiras longitudinais de ganchos mas diferem no número de ganchos por fileira. A comparação dos dados entre *Dollfusentis* n. sp. e *D. chandleri*, espécie previamente reportada no Rio de Janeiro, mostram respectivamente 16–17 ganchos vs 22–24 segundo Golvan (1969) e 19–21 segundo Salgado–Maldonado (1976). Adicionalmente, *D. chandleri* pode também ser diferenciada pelo menor tamanho dos ganchos basais verticais (10–15 vs 15–20) e tamanho dos ovos (80 x 12–18 vs 63–75 x 15). *Dollfusentis bravoae* é mais parecida morfológicamente com a nova espécie, já que também possui 16–17 ganchos, enquanto *D. salgadoi* apresenta 17–19 ganchos.

Os testículos da nova espécie são maiores (280–350; 200–340) do que os de *D. chandleri* (187–300; 187–283) e *D. bravoae* (192–236; 164–222). A nova espécie também possui um útero longo (225–325) em comparação com *D. bravoae* (102–114), *D. salgadoi* (100–175) e *D. chandleri* (150–281). Os espinhos do tronco de *Dollfusentis* n. sp. estão distribuídos de modo mais espaçado, com os espinhos maiores medindo 60–85 enquanto em *D. bravoae* um número maior de espinhos é encontrado e os maiores chegam a medir 41–57. *Dollfusentis ctenorhynchus* e *D. longispinus* podem ser facilmente diferenciados quando comparados a nova espécie pelo número de ganchos na probóscida (19–21 e 22, respectivamente), e por possuírem um sistema reprodutor feminino de menor tamanho sendo 540 e 600, respectivamente x 690–1.150. A associação com o hospedeiro, juntamente com a distribuição geográfica e a divergência genética das espécies mais próximas *D. chandleri* e *D. bravoae* fornecem suporte para o reconhecimento de uma nova espécie.

4.2.4 *Análise Filogenética*

As análises filogenéticas foram conduzidas usando três regiões do DNA. Os dois primeiros alinhamentos foram construídos com sequências de DNA nuclear (18S e 28S) (Fig. 9 e 10) da nova espécie e *D. bravoae*, junto com sequências de outros membros da família Illiosentidae e outros palaeacanthocefalos utilizados como “outgroups”. Estas análises, mostraram os membros da família Illiosentidae como um grupo monofilético, com um alto suporte estatístico.

A árvore do gene 18S rDNA não mostrou diferença entre os dois isolados da nova espécie e de *D. bravoae*. Entretanto, na árvore do gen 28S rDNA mostrou ambas espécies de *Dollfusentis* como irmãos.

Foi também construído um alinhamento para a região mitocondrial do COI que incluíram sete sequências da nova espécie, 5 sequências de *D. bravoae* e 10 de *D. chandleri* (não publicadas) disponíveis no GenBank. O alinhamento também incluiu outras cinco espécies da família Illiosentidae e seis palaeacanthocefalos como “outgroup”. A árvore filogenética de COI mostrou a família Illiosentidae como um grupo monofilético, e as três espécies de *Dollfusentis* formando também um grupo monofilético, em ambos os casos com alto suporte estatístico (Fig. 11). Adicionalmente, a Figura 11 mostrou que *D. chandleri* e *D. bravoae* são espécies irmãs (relação inferida com baixo valor estatístico) e que a nova espécie do Brasil é irmã destas duas.

A divergência genética estimada de acordo com *p-distance* para a região COI mtDNA entre *Dollfusentis* n. sp. e *D. bravoae* do México, variou de 6.5 a 7.1% e entre *Dollfusentis* n. sp. e as sequências não publicadas de *D. chandleri* foi de 6.6 a 8.2%. A nova espécie difere destas duas de 6.5 to 8.2%.

4.2.5 Resenha taxonômica

Hospedeiro tipo: Orthopristis ruber (Cuvier, 1830)

Localidade tipo: costa do Rio de Janeiro, Urca, Brasil.

Sítio de infecção: intestino

Espécimes coletados: 343

Prevalência: 63% (109 peixes examinados/ 69 infectados).

Intensidade de infecção: 1–27 acantocéfalos por peixe.

Novas sequências representativas de DNA com números de acesso depositados no GenBank: *Dollfusentis* n. sp. - 18S rDNA (MK282744, MK282745); 28S rDNA (MK282746 – MK282753); COI mtDNA (MK294053 – MK294059); ITS1-5.8 -ITS2 rDNA MK282742, MK282743). *D. bravoae* do México - 18S rDNA (MK282759); 28S rDNA (MK282754) e COI mtDNA (MK294060–MK294064).

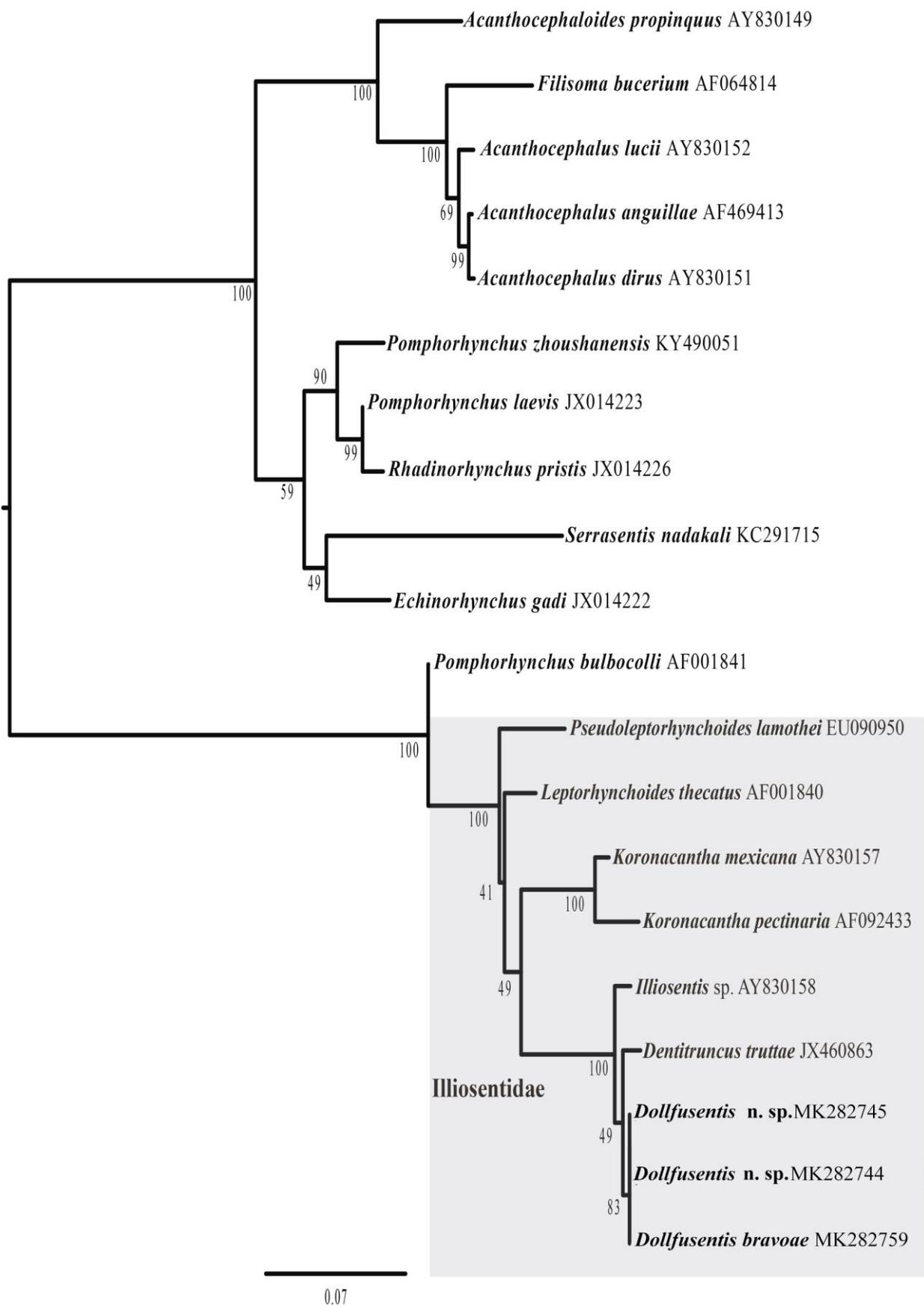


Figura 9 Árvore filogenética por Máxima Verossimilhança referente ao 18S rDNA. Números mostram valores de *bootstrap* inferidos por 10.000 replicatas. Área cinza refere-se as espécies incluídas na família Illiosentidae em comparação com outros membros da classe Palaeacanthocephala.

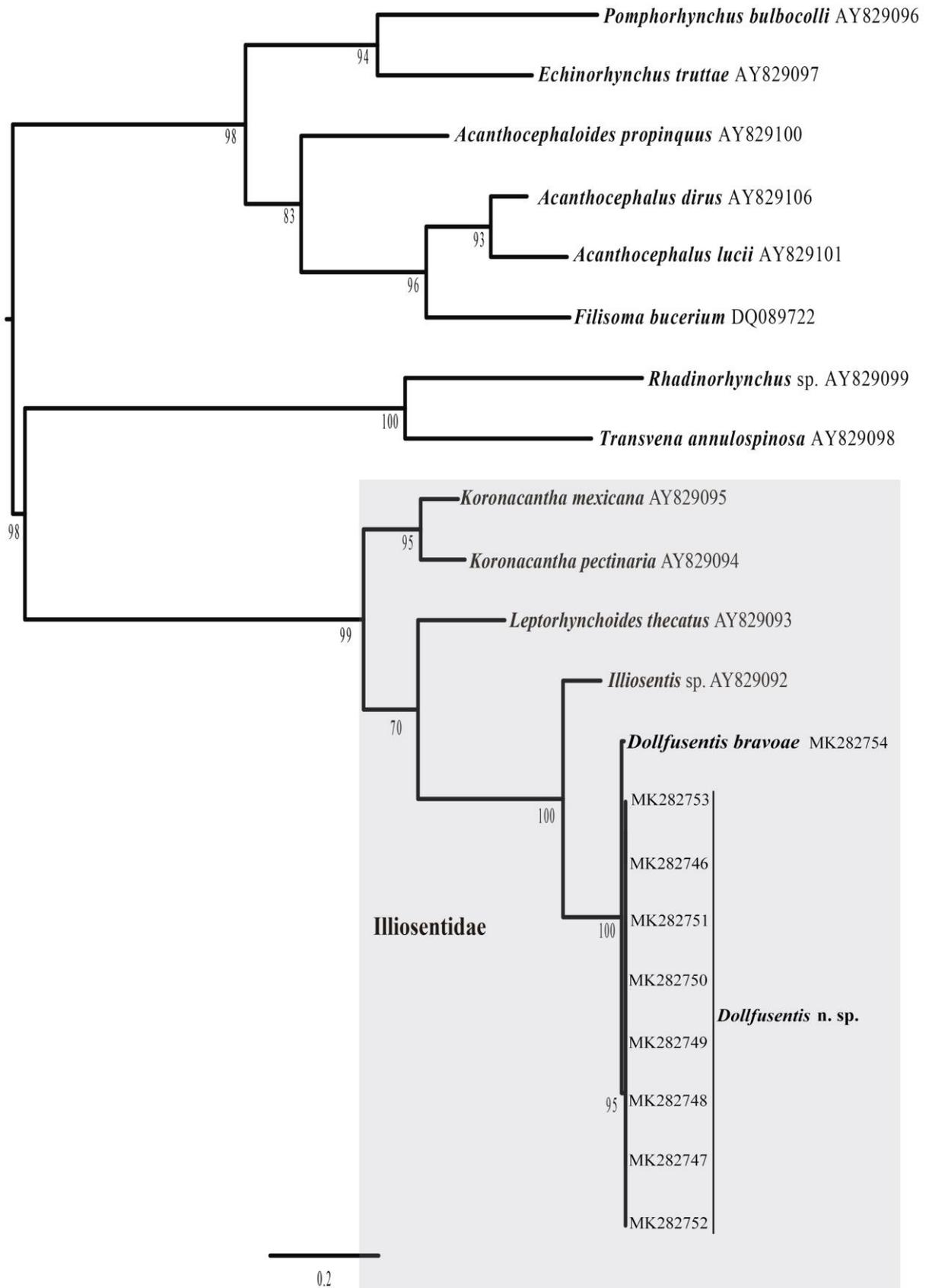


Figura 10 Árvore filogenética por Máxima Verossimilhança referente ao 28S rDNA. Números mostram valores de *bootstrap* inferidos por 10.000 replicatas. Área cinza refere-se as espécies incluídas na família Illiosentidae em comparação com outros membros da classe Palaeacanthocephala.

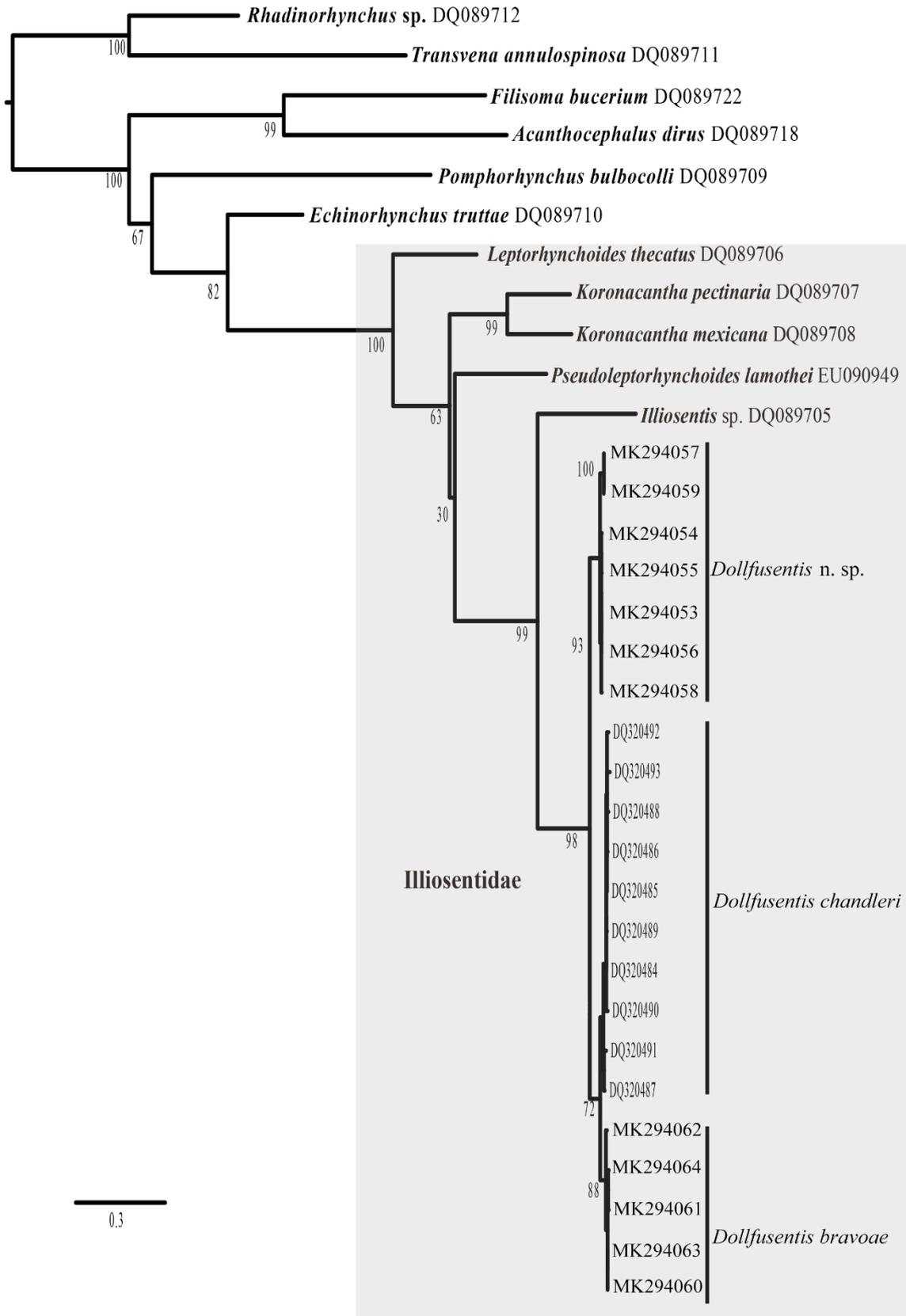


Figura 11 Árvore filogenética por Máxima Verossimilhança referente a região COI mtDNA. Números mostram valores de *bootstrap* inferidos por 10.000 replicatas. Área cinza refere-se as espécies incluídas na família Illiosentidae em comparação com outros membros da classe Palaeacanthocephala.

4.3 Elementos traço

4.3.1 *Acantocéfalos e Peixes*

Um estudo ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizado em cada um dos espécimes de *Dollfusentis* e avaliados pela técnica de EDS (Fig. 12). As áreas de análise selecionadas manualmente por meio do “point and shooting” estão apresentadas na Figura 13.

Um total de 33 espectros provenientes de 11 acantocéfalos (probóscida, tronco médio e posterior) e 36 espectros dos tecidos de quatro peixes (fígado, musculo e brânquias) foram analisados. Os espectros representativos entre parasito e hospedeiro estão representados nas Figuras 14 e 15.

Na microanálise qualitativa foram identificados um total de 15 elementos tanto nos acantocéfalos quanto nos tecidos dos peixes: Carbono (C), Nitrogênio (N), Oxigênio (O), Magnésio (Mg), Alumínio (Al), Silício (Si), Fósforo (P), Enxofre (S), Potássio (K), Cálcio (Ca), Ferro (Fe), Zinco (Zn), Cloro (Cl), Cobre (Cu) e Sódio (Na). A prevalência de amostras positivas (parasito e peixe) para cada elemento é apresentada na Tabela 2. A análise semi-quantitativa (wt%) de cada um dos elementos traço identificados nas amostras está apresentada na Tabela 3.

Em uma análise descritiva, o metal Al foi encontrado nos três órgãos de todos os peixes com maiores valores médios encontrados no fígado (0,54) enquanto em 96,97% dos acantocéfalos examinados, o maior wt% foi 0,50 na região posterior do tronco. O Fe foi encontrado em 47,2% dos peixes com maior valor encontrado no fígado (0,56 wt%) e 72,7% dos acantocéfalos tiveram 0,11 wt% também na região posterior do tronco. O Zn foi encontrado apenas nas brânquias de 2,8% dos peixes com valor de 0,14 wt% e em 100% nas três regiões dos acantocéfalos variando de 0,40 a 0,50 wt%. O Cu foi também identificado apenas nas brânquias em 2,8 % dos peixes enquanto em 18,2% dos acantocéfalos ele ocorreu nas três regiões variando de 0,18 a 0,46 wt%. O semimetal Si foi indentificado no fígado de apenas 2,8% dos peixes (0,05 wt%) mas em 72,7% dos parasitos, ele ocorreu nas três regiões variando de 0,09 a 0,15 wt%. O elemento P estava presente em 100% das amostras analisadas. Outros elementos com maiores prevalências no parasito foram também S, Ca e Cl. Os elementos Mg, K e Na foram mais prevalentes nos peixes (Tabelas 2 e 3).

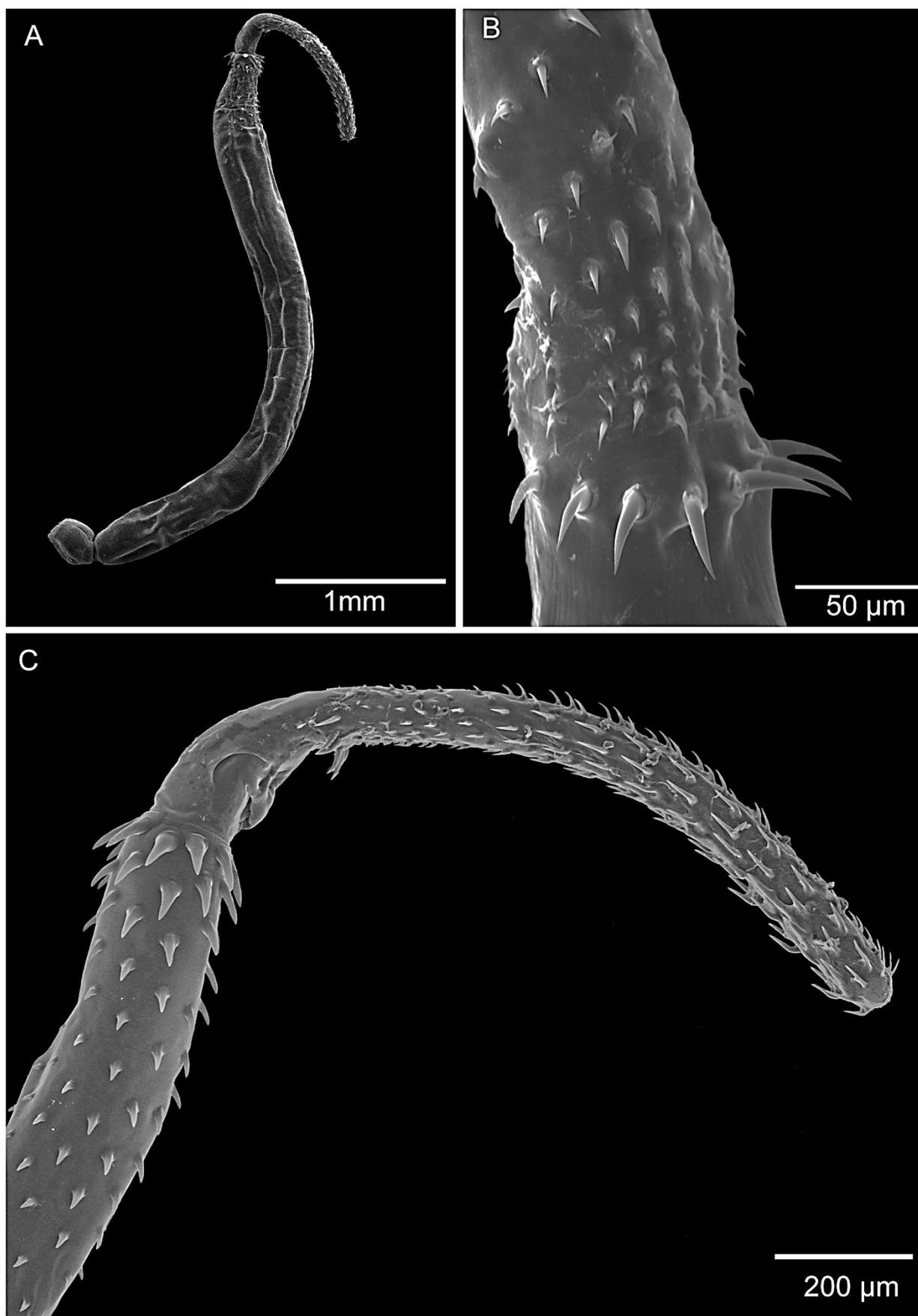


Figura 12 Microscopia eletrônica de varredura de *Dollfusentis* sp. (A) Macho, vista total; (B) Separação entre os ganchos basais e ventral crescente; (C) Probóscida com 16 ganchos, pescoço inerte e tronco armado na região anterior.

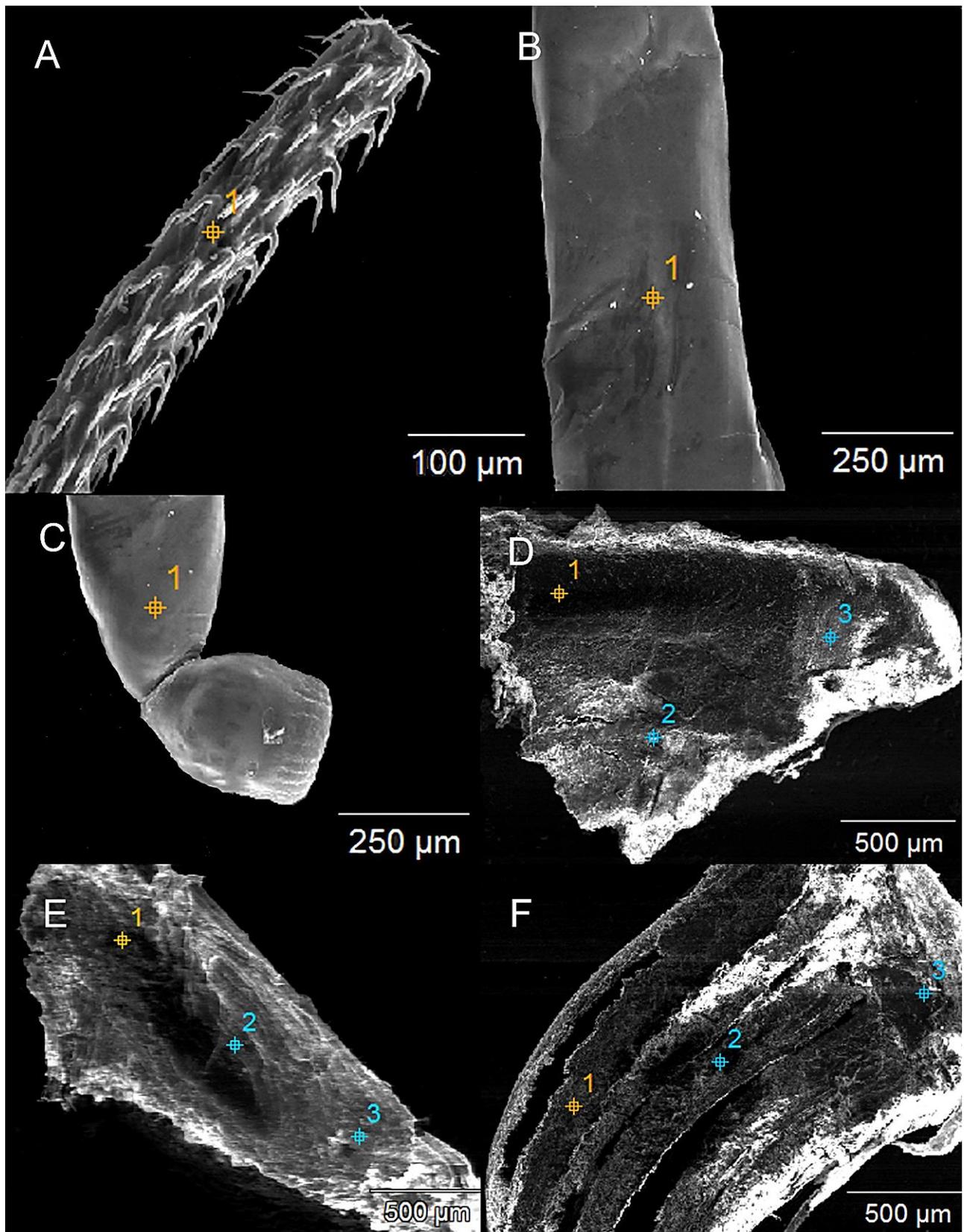


Figura 13 Micrografia das amostras utilizadas no MEV-EDS. Pontos 1,2 e 3 correspondem a área de análise selecionada para obtenção dos espectros. (A) probóscida; (B) região mediana do tronco; (C) região posterior do tronco; (D) fígado; (E) musculatura; (F) brânquia.

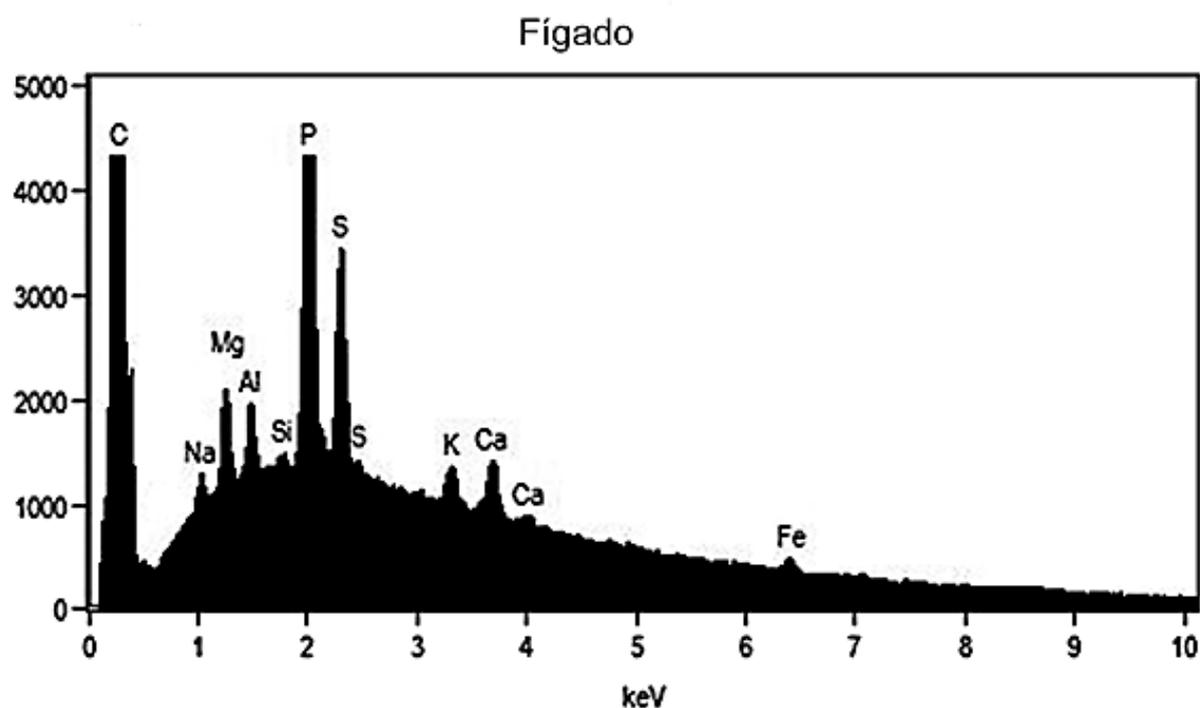
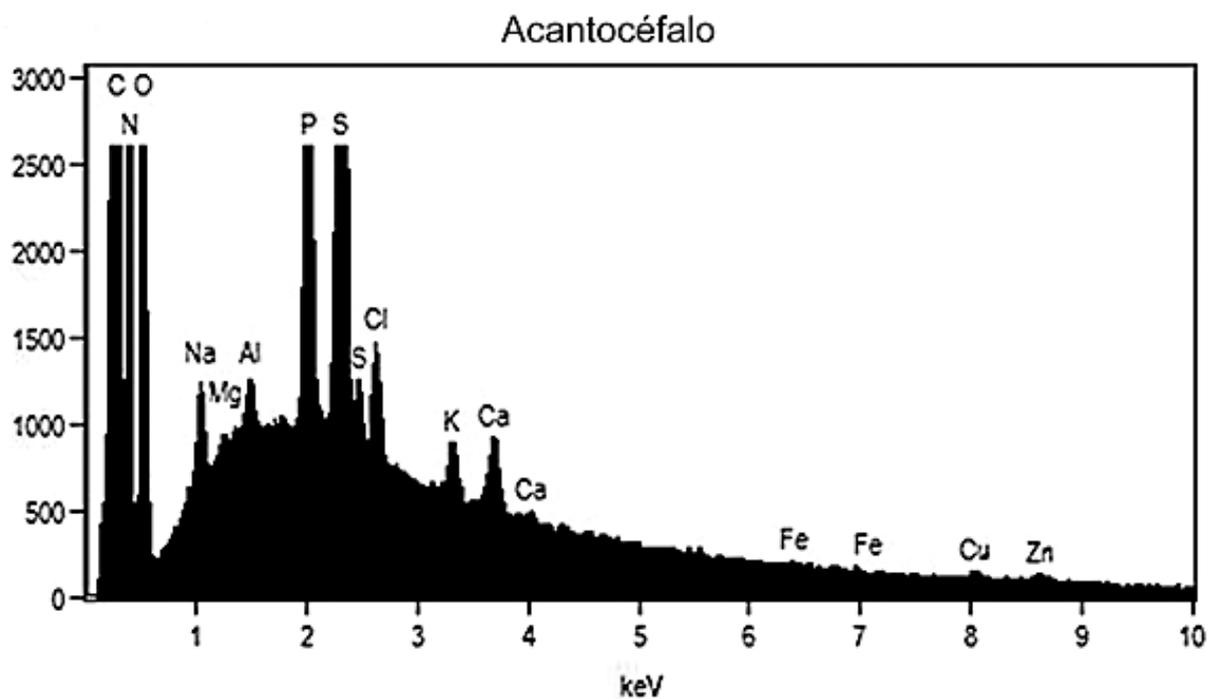


Figura 14 Microanálise qualitativa (espectros) obtidos por MEV-EDS no acantocéfalo e fígado do peixe *Orthopristis ruber*.

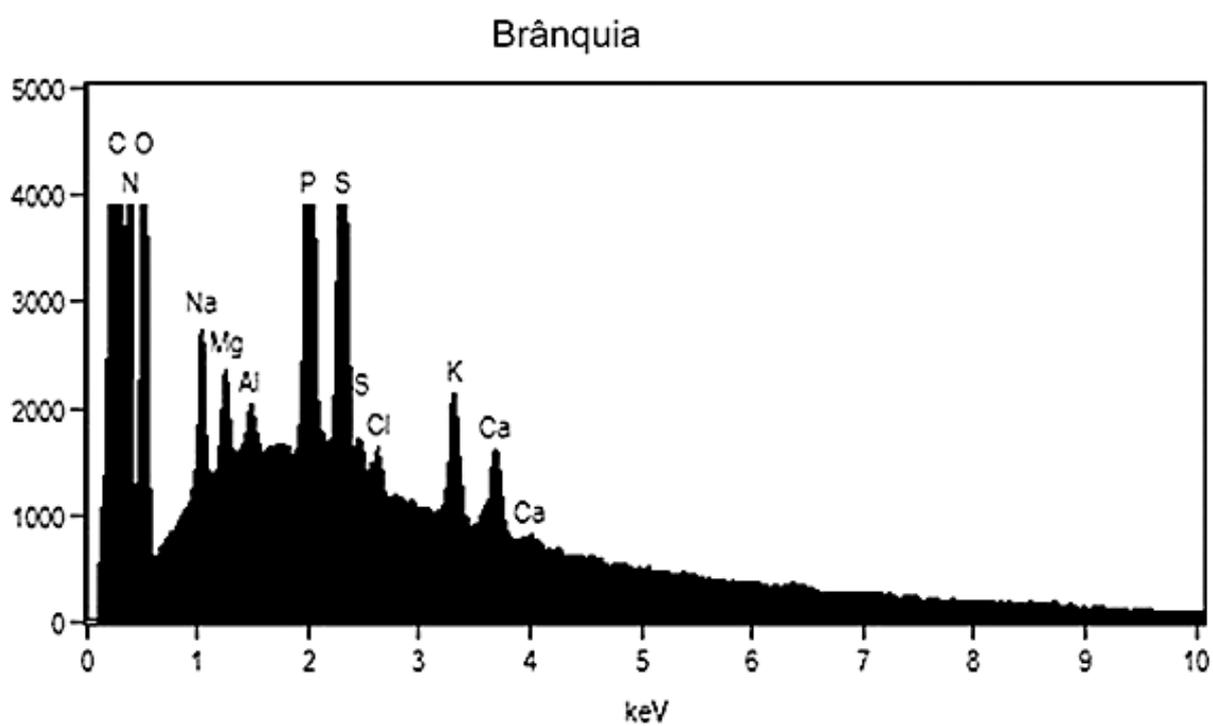
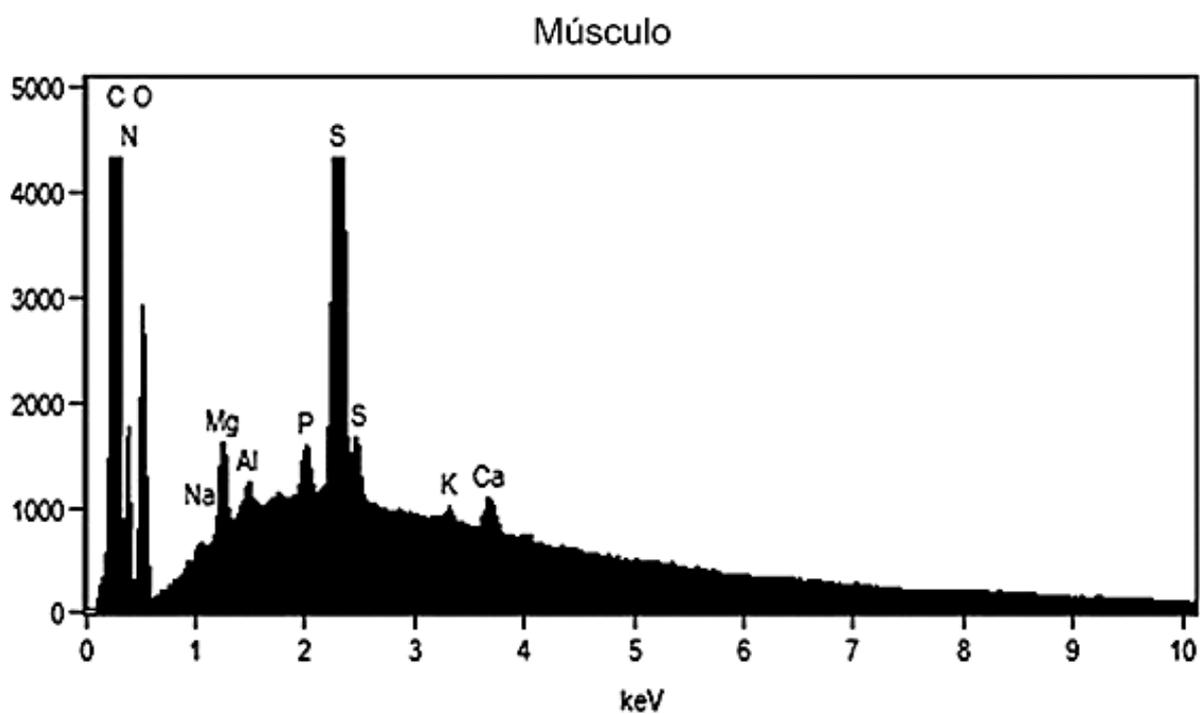


Figura 15 Microanálise qualitativa (espectros) obtidos por MEV-EDS no músculo e brânquia do peixe *Orthopristis ruber*.

Tabela 2 Prevalência (%) de amostras positivas para cada elemento.

Elemento	Parasito	Peixe
Mg	54,55	80,56
Al	96,97	100
Si	72,73	2,78
P	100	100
S	100	97,22
K	69,7	72,22
Ca	96,97	88,89
Fe	72,73	47,22
Zn	100	2,78
Cl	66,67	25
Cu	18,19	2,78
Na	24,25	66,67

Tabela 3 Análise semi-quantitativa (wt%) de cada elemento traço identificado nas amostras. Dados expressos em média seguido de desvio padrão. n = número de espectros analisados.

		Mg	Al	Si	P	S	K
Parasito (n=33)	Probóscida (n=11)	0,10 ± 0,04 (n=4)	0,22 ± 0,16 (n=10)	0,15 ± 0,11 (n=8)	2,17 ± 2,49 (n=11)	1,68 ± 0,71 (n=11)	0,16 ± 0,2 (n=8)
	Mediana (n=11)	0,05 ± 0,02 (n=7)	0,18 ± 0,05 (n=11)	0,09 ± 0,04 (n=7)	0,91 ± 0,22 (n=11)	2,05 ± 0,65 (n=11)	0,15 ± 0,08 (n=7)
	Posterior (n=11)	0,04 ± 0,01 (n=7)	0,50 ± 0,49 (n=11)	0,11 ± 0,08 (n=9)	1,21 ± 0,72 (n=11)	2,07 ± 0,97 (n=11)	0,20 ± 0,19 (n=8)
Peixe (n=36)	Fígado (n=12)	0,22 ± 0,16 (n=7)	0,54 ± 0,69 (n=12)	0,05 (n=1)	2,43 ± 1,57 (n=12)	1,86 ± 2,02 (n=12)	0,45 ± 0,55 (n=9)
	Músculo (n=12)	0,30 ± 0,17 (n=11)	0,42 ± 0,46 (n=12)	–	1,08 ± 1,16 (n=12)	2,71 ± 1,95 (n=11)	0,59 ± 0,43 (n=10)
	Brânquia (n=12)	0,21 ± 0,05 (n=11)	0,38 ± 0,57 (n=12)	–	5,49 ± 7,71 (n=12)	2,48 ± 1,38 (n=12)	0,93 ± 0,46 (n=7)
		Ca	Fe	Zn	Cl	Cu	Na
Parasito (n=33)	Probóscida (n=11)	0,57 ± 0,44 (n=10)	0,09 ± 0,04 (n=9)	0,49 ± 0,37 (n=11)	0,19 ± 0,12 (n=8)	0,46 (n=1)	0,37 ± 0,21 (n=3)
	Mediana (n=11)	0,24 ± 0,1 (n=11)	0,05 ± 0,02 (n=6)	0,50 ± 0,27 (n=11)	0,33 ± 0,27 (n=5)	0,28 ± 0,17 (n=4)	0,37 ± 0,09 (n=3)
	Posterior (n=11)	0,32 ± 0,22 (n=11)	0,11 ± 0,07 (n=9)	0,50 ± 0,34 (n=11)	0,33 ± 0,32 (n=9)	0,18 (n=1)	0,52 (n=2)
Peixe (n=36)	Fígado (n=12)	0,76 ± 0,83 (n=10)	0,56 ± 0,65 (n=8)	–	0,28 ± 0,26 (n=4)	–	0,16 ± 0,06 (n=9)
	Músculo (n=12)	0,35 ± 0,33 (n=10)	0,13 ± 0,21 (n=4)	–	0,06 ± 0,03 (n=2)	–	0,2 ± 0,09 (n=8)
	Brânquia (n=12)	11,4 ± 19,83 (n=12)	0,13 ± 0,1 (n=4)	0,14 (n=1)	0,15 ± 0,09 (n=3)	0,29 (n=1)	0,31 ± 0,20 (n=7)

Nas três regiões dos acantocéfalos, a comparação do wt% de todos os elementos utilizando o ANOVA, mostrou diferenças significativas no Mg, Ca e Al, com a maior concentração de Mg e Ca na probóscida e Al na região posterior do tronco (p -value <0.05). Não foram observadas diferenças significativas entre os outros elementos identificados nas três regiões dos parasitos (todos p -value >0.05).

Nas amostras de tecidos dos peixes, a comparação do wt% de todos os elementos utilizando ANOVA evidenciou que o Ca foi o único elemento com diferenças significativas, com a maior concentração nas brânquias (F-value=4,23, p -value=0,02). Não foi possível obter análise de variância dos elementos Si, Zn e Cu já que Si foi encontrado apenas no fígado e Zn e Cu apenas nas brânquias.

Comparando-se todas as amostras analisadas, a ANOVA mostrou que Al, Cl, e Na não tiveram diferenças significativas entre as regiões do acantocéfalo e dos tecidos do peixe (p >0.05). Entretanto, Mg, P, K, Ca e Fe mostraram ter diferenças significativas nas concentrações com valores mais acentuados nos tecidos dos peixes (p <0.05).

O teste qui quadrado mostrou que Si e Zn estão presentes em maior número de amostras positivas nos parasitos do que nos peixes (Silício: Qui-quadrado X^2 = 15.8816, p -value<0.001 e Zinco: Qui-quadrado X^2 = 21.8931, p -value <0.001). O Cl e Na apareceram no valor limite de significância, Qui-quadrado X^2 =3.7405, p -value = 0,05 e Qui-quadrado X^2 =3.8242, p -value = 0,05, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

5.1 Taxonomia Integrativa

A história taxonômica das espécies que compõem o gênero *Dollfusentis* é confusa, provavelmente pela sobreposição das características morfológicas. Atualmente, cinco espécies são consideradas válidas: *D. chandleri*, *D. bravoae*, *D. salgadoi*, *D. ctenorhynchus* e *D. longispinus* (Monks et al. 2008), apesar de Amin (2013) considerar seis espécies válidas, por manter *Illiosentis heteracanthus* no gênero. Sua relação filogenética também não foi estudada sendo que até o presente estudo poucos dados moleculares estavam disponíveis para comparação.

Golvan (1969) criou o gênero *Dollfusentis* com a espécie tipo *Dollfusentis chandleri* (= *Telosentis tenuicornis* (Linton 1905) Van Cleave, 1947, *Echinorhynchus pristis tenuicornis* Linton, 1905, *Rhadinorhynchus tenuicornis* Van Cleave, 1918 e *Echinorhynchus incrassatus* Molin sensu Linton, 1888). Este autor também incluiu no gênero: *Dollfusentis longispinus* (Cable e Linderoth, 1963), *Dollfusentis heteracanthus* (Cable e Linderoth, 1963) e *Dollfusentis ctenorhynchus* (Cable e Linderoth, 1963). Entretanto, Monks e Pulido-Flores (2002) retornaram *D. heteracanthus* para *Illiosentis heteracanthus*.

Bullock e Mateo (1970) sugeriram que os espécimes de *R. tenuicornis* redescritos por Chandler (1934) correspondiam a *D. longispinus*. Porém, Bucker et al. (1978) relataram que Bullock, em comunicação pessoal, estava incerto sobre o status desta espécie e consideraram todas aquelas originárias do Norte do Golfo do México como sendo *D. chandleri*. Adicionalmente, o tamanho dos lemniscos descrito a partir de um único espécime de *D. longispinus* como tendo o dobro do comprimento do receptáculo da probóscida, revelou ter tamanho variável entre as espécies que compõem o gênero. Embora Amin (2013) considere seis espécimes pertencentes ao gênero *Dollfusentis* e também *D. longispinus* como a espécie-tipo, em seu trabalho anterior (Amin, 1998) foi referido que a “sinonímia sugerida com *D. chandleri* poderia ser validada após estudo cuidadoso de uma longa série de espécimes e análise de dados”.

D. chandleri foi originalmente descrito como um parasito de *Micropogonias undulatus* (Linnaeus, 1766) e *Leiostomus xanthurus* Lacepède, 1802 em Galveston Bay, Texas, incluindo também *Cynoscion arenarius* Ginsburg, 1930 e *Orthopristis chrysopterus* Linnaeus, 1766 (Golvan 1969). Relatos adicionais desta espécie incluem

uma ampla variedade de hospedeiros marinhos e de água salobra. No México, esta espécie foi reportada em 10 espécies de peixes, aparentemente mostrando especificidade de hospedeiro muito baixa (García-Prieto et al. 2010).

As outras duas espécies reportadas da costa do Atlântico e do mar do Caribe do México eram aparentemente hospedeiro-específicas com *D. bravoae* parasitando *Pomadasys croco* (Cuvier, 1830) da lagoa Sontecomapan, Veracruz (Salgado-Maldonado 1976) e *D. salgadoi* descrita como parasito de *Eugerres plumieri* (Cuvier 1830) da Baía de Chetumal (Monks et al. 2008). Entretanto, espécimes de *D. bravoae* são agora também referidos em *E. plumieri* da lagoa de Sontecomapan. Finalmente, outras duas espécies foram descritas de peixes marinhos no Caribe, *D. ctenorhynchus* do mullídeo *Upeneus martinicus* (= *Mullodichthys martinicus* Cuvier, 1829), e *D. longispinus* do haemulídeo *Anisotremus virginicus* (Linnaeus 1758), ambos na Jamaica (Golvan 1969). Apesar da amplitude de distribuição de algumas espécies de peixes se estender do Norte ao Sul das Américas, parece haver um “gap” na distribuição das espécies de *Dollfusentis*. Ainda são necessários dados adicionais de peixes marinhos da América Central para que esta hipótese possa ser testada.

Apesar da complexa história taxonômica, aparentemente *D. chandleri* possui uma extensa distribuição pela costa Atlântica das Américas, do Golfo do México ao sul do Brasil (Chandler 1934; Golvan 1969; Kohn e Macedo, 1984; Alves e Luque, 2001; García-Prieto et al. 2010). Adicionalmente, a espécie exibe baixa especificidade de hospedeiro, já que apesar de parasitar principalmente cocorocas da família Haemulidae Gill, 1885, já foram também encontradas em grupos não relacionados, tais como, sparídeos, gerreídeos, sciaenídeos, carangídeos, etc.

No Brasil, Kohn e Macedo (1984) foram as primeiras autoras a reportar *D. chandleri* na costa do Rio de Janeiro parasitando *Haemulon sciurus* (Shaw, 1803). Depois Noronha et al. (1986) reportaram este acantocéfalo em *Archosargus rhomboidalis* (Linnaeus, 1758), *Eucinostomus argenteus* Baird e Girard, 1855, *Umbrina coroides* Cuvier, 1830 e *Haemulon sciurus* (Shaw, 1803). Luque et al. (1996) reportaram em *Orthopristis ruber* e Alves e Luque (2001) reportaram em *Micropogonias furnieri* (Desmarest 1823).

O reexame dos espécimes de *D. chandleri* de *H. sciurus* do Rio de Janeiro, depositados na CHIOC sob os números 31981, 21982 (A–G), e 32100 (A–B), mostraram que todos possuíam 12-14 fileiras longitudinais com 16-17 ganchos, correspondendo com a variação e a morfologia da nova espécie, e assim, deveriam ser renomeadas. As lâminas da CHIOC n° 32195 e 32196 de *E. argenteus*, 32204 de

A. rhomboidalis, 34022 de *M. furnieri* e 32194 e 32198 de *U. coroides* de áreas próximas, não estavam em bom estado, necessitando de novo material para realizar uma identificação mais fidedigna.

As espécies de *Dollfusentis*, possuem uma alta variabilidade intraespecífica, morfologia interespecífica muito similar e poucos parâmetros morfológicos para identificação, como relatados por Salgado Maldonado (1976). Todas as medidas dos caracteres morfológicos utilizados para descrição das espécies de *Dollfusentis*, mostraram um certo grau de sobreposição, dificultando uma distinção precisa entre elas. O principal critério diferencial parecia ser o número de ganchos por fileira na probóscida, embora não haja consenso na literatura sobre o número de ganchos necessários para diferenciar as espécies. Golvan (1969) referiu *D. chandleri* coletados na Baía de Galveston, Texas, USA com 12–14 fileiras longitudinais com 22–24 ganchos. Salgado-Maldonado (1976) redescreveu esta espécie a partir de indivíduos coletados de haemulídeo da costa da Ilha de Cozumel no Caribe Mexicano com 13–14 fileiras com 19–21 ganchos. O mesmo autor ressaltou que *D. chandleri* era muito similar a *D. bravoae* pelo aspecto geral do acantocéfalo, mas que *D. bravoae* poderia ser diferenciada por possuir 13-14 fileiras de 16-17 ganchos, ter maior separação entre os ganchos crescentes ventrais e os ganchos basais verticais, ter espinhos anteriores do tronco maiores e ausência de um vestíbulo genital nas fêmeas.

Além disso, Monks et al. (2008) notaram que a forma da musculatura da porção terminal da fêmea e a ausência/presença de um vestíbulo genital poderiam ser critérios utilizados para diferenciar as espécies *D. chandleri*, *D. bravoae* e *D. salgadoi* que o autor descreveu da Baía de Chetumal. Entretanto, a validade destes caracteres para diferenciação taxonômica é incerta. A ausência de um vestíbulo genital nas fêmeas pode ser devido a contração da sua musculatura e ou pelo processo de fixação do parasito (Perkins et al. 2011) e a diferença nas bandas musculares ainda não está clara. O mesmo autor, também utilizou o termo “espinhos genitais” para separar as espécies de *Dollfusentis*. Entretanto é necessário ter cautela ao utilizar o termo, já que embora tais espinhos estejam localizados na parte posterior do tronco, eles não estão associados ao poro genital. Em todos os casos, Monks et al. (2008) referiram que *D. longispinus*, *D. bravoae* e *D. salgadoi*, possuíam estes espinhos e que este carácter separou estas espécies de *D. chandleri* e *D. ctenorhynchus*. Isto ainda é controverso pois embora Monks et al. (2008) tenham mencionado que *D. chandleri* não tinha estes espinhos, a redescrição feita por Salgado Maldonado (1976) mencionou a presença irregular de espinhos distribuídos na porção posterior do tronco dos machos.

Considerando-se a distribuição geográfica, as espécies do gênero foram descritas de peixes do Golfo do México e do Mar do Caribe, mas segundo o *Fishbase* (Froese e Pauly 2018) a maioria dos peixes reportados estão distribuídos entre o Golfo do México e o Brasil. No entanto, é possível que uma “área de inibição” entre as latitudes 10°S a 10°N (veja Santos e Carbonel 2000), possa afetar a distribuição destes parasitos. Esta barreira ambiental inclui: 1) baixa salinidade no delta do rio Amazonas que estende a condição estuarina mar adentro com excesso de sedimento em suspensão e 2) as correntes do Norte do Brasil e da Guiana fluindo em direção ao noroeste do continente.

Neste estudo usamos informações morfológicas com associação de dados de hospedeiro e distribuição geográfica para descrever a nova espécie de *Dollfusentis* de peixes marinhos da costa do Brasil. O reconhecimento da nova espécie foi também suportado por análise molecular. Os dois genes nucleares do rDNA (18S e 28S) confirmaram o pressuposto que *Dollfusentis* pertence à família Illiosentidae, apesar de não serem variáveis o suficiente para separar a nova espécie de *D. bravoae*. Entretanto a árvore da região mitocondrial COI, mostrou que os espécimes de *Dollfusentis* do Brasil representam uma linhagem monofilética, com moderado suporte estatístico e separou de *D. bravoae* do México e de *D. chandleri*. A divergência genética do COI, também corrobora a confirmação de uma nova espécie que difere das outras duas espécies de 6.5 a 8.2%.

A divergência genética do COI entre espécies (ou linhagens) de acantocéfalos pertencentes a outras famílias é variável, sendo esta variação de 6 a 21%. Steinauer et al. (2007) reportaram uma divergência de 6.3 a 11.6% entre três linhagens de *Leptorhynchoides thecatus*, um parasito de peixe de água doce. García-Varela e Pérez-Ponce de León (2008) encontraram valores de divergência para o mesmo marcador molecular de 11 - 21% entre espécies alocadas em diferentes gêneros de acantocéfalos polimorfídeos que infectam aves aquáticas e mamíferos marinhos. Pinacho-Pinacho et al. (2012) reportaram uma variação uma grande divergência (20.3-21.03%) entre duas espécies de *Neoechinorhynchus* parasitos de peixes de água salobra.

A taxonomia integrativa com uso de dados morfológicos, sequências de DNA e dados de distribuição geográfica, foi de grande valia para sugerir que espécimes de *Dollfusentis* do Brasil representam uma nova espécie. Assim sendo, este estudo taxonômico possibilitou identificar de forma mais fidedigna a espécie submetida a análises de elementos traço.

5.2 Elementos traço

Os acantocéfalos não têm trato digestório e absorvem os nutrientes disponibilizados no intestino dos hospedeiros pelo próprio tegumento (Santos et al. 2013). Segundo Brazová et al. (2015) os parasitos intestinais competem com seu hospedeiro na absorção de elementos essenciais como Ca, Cu, Mg e Zn disponíveis no meio ambiente. Esta dinâmica de interação parasito-hospedeiro foi observada na comparação entre as regiões dos acantocéfalos com os tecidos do peixe, onde Si, Zn e Cu foram mais prevalentes nos parasitos, o wt% de Mg, P, K, Ca e Fe foram mais significativos nos peixes, enquanto as diferenças de wt% do Al, Cl e Na não foram significativas.

Em nosso estudo um total de 15 elementos foram identificados, e embora tenha sido detectado Al, foram utilizados suportes de carbono com cobertura também de carbono para minimizar a interferência do Al e Au nas análises. Heckmann et al. (2007), detectaram elementos em ganchos, tronco e ovos de várias espécies de seis espécies de acantocéfalos utilizando o MEV-EDS. Os autores demonstraram a presença de apenas três elementos nos acantocéfalos, sendo Al no tronco e ganchos de uma espécie e Au e S em todas as seis espécies. Entretanto, nos ovos de *Neoechinorhynchus qatarensis* encontraram 7 elementos: Na, Mg, Al, Si, P, S e Ca. O método de preparação de suas amostras incluía suportes de Al e metalização com Au, o que não é indicado pois podem interferir na obtenção dos espectros. É interessante ressaltar que o Al foi encontrado em todas as nossas regiões analisadas, tanto do parasito quanto do hospedeiro, mas o Au não foi detectado.

O tempo de análise que Heckmann et al. (2007) utilizaram foi de 60 segundos. Entretanto, Morais e Malta (2014) ao analisarem metacercárias de trematódeos, encontraram além dos elementos por nós detectados, Pb (chumbo), Mn (manganês), Pt (platina), W (tungstênio) e Co (cobalto). Entretanto, os autores utilizaram um tempo de detecção de 300s e apontaram a necessidade do aumento na análise do EDS para detecção de elementos com concentrações muito baixas. Em nossa análise, apesar do tempo de exposição ter sido de 100s, outros elementos como Chumbo (Pb) Cádmiio (Cd) e Cromo (Cr) talvez pudessem ter sido revelados caso o tempo de exposição pudesse ter sido aumentado,

O Ca foi encontrado em nosso estudo nas três regiões do parasito com a maior proporção de Ca na probóscida com valores mais altos (0,57 wt%) em relação as regiões do tronco (0,24 e 0,32 wt%). Já nos peixes, o Ca foi o único elemento que

apresentou diferença significativa entre os tecidos, com maior percentual nas brânquias (11,4 wt%) em relação ao fígado (0,76 wt%) e ao músculo (0,35 wt%). Esta diferença pode estar relacionada com o fato da inserção do feixe de elétrons ter sido feita diretamente ou muito próxima de uma região óssea nas brânquias. Com relação ao Si, foi encontrado em 72,73% dos parasitos nas três regiões analisadas (0,09-0,15 wt%) mas apenas no fígado dos peixes (0,05 wt%), e este percentual pode estar relacionado a alta capacidade de contração dos parasitos como apontado por Brazova et al. (2014). Os mesmos autores ao utilizarem a técnica de MEV-EDS detectaram no tegumento da probóscida de acantocéfalos apenas Ca e Si. Segundo Brazova et al. (2014), estes elementos estão envolvidos com a capacidade de contração e flexibilidade da probóscida durante a fixação do parasito no tecido do hospedeiro. Além disso, o Si está presente em vários tipos celulares como ossos e tecido conjuntivo dos animais e são reconhecidos como importante nutriente para fitoplancton marinho (Baker et al., 2017).

Os metais traço estão amplamente difundidos no ecossistema aquático geralmente em baixas concentrações, sendo originários de diferentes fontes (ex: eólica, rios, etc.), processos naturais como deposição atmosférica de elementos traço solúveis e remineralização e por ação antrópica, expondo os organismos que ali vivem a vários destes elementos (Gilbert 2018; Sánchez et al. 2019). Apesar da maioria dos elementos encontrados neste estudo serem considerados essenciais aos organismos, o Al é um elemento não essencial que pode causar efeitos negativos, degeneração no sistema nervoso, mesmo em baixas concentrações (Moura et al. 2018). Neste estudo, o Al foi detectado nas três regiões de 96,97% dos parasitos (0,18 a 0,50 wt%) e em 100% dos peixes (0,38 a 0,54 wt%), resultado que não pode estar associado ao uso de suportes de alumínio na preparação das amostras mas pode estar ligado a contaminação do ambiental.

Estudos sobre a condição ambiental na Baía de Guanabara mostraram que mesmo os elementos essenciais, quando em altas concentrações, podem causar efeitos negativos nos organismos (Fistarol et al. 2015; Soares Gomes et al. 2016). Recentemente, de Carvalho Aguiar et al. (2018) revelaram que a parte oeste da Baía de Guanabara possui riscos alarmantes de contaminação por Zn, com forte potencial de biodisponibilidade. Nossa área de coleta nas proximidades da Urca, considerada parte oeste próximo à entrada da baía, apresenta fluxo de barcos e ancoradouros nas proximidades, recebendo também contaminantes urbanos, principalmente em épocas de chuva. Lugares com estas características estão propensos a serem afetados

especialmente por Cu e Zn, componentes usualmente presentes na composição de revestimentos anti-incrustantes e pinturas de barcos (de Carvalho Aguiar et al. 2016). O Zn foi encontrado em 100% dos acantocéfalos, nas três regiões analisadas, com maior valor (0,49-0,50 wt%) do que nos peixes onde foi encontrado apenas em uma brânquia (0,14 wt%). Mesmo não sendo significativa a diferença entre a detecção do Cu entre parasitos e a brânquia de um dos peixes, a técnica do MEV-EDS foi eficiente para evidenciar a ocorrência deste elemento pode estar associado a contaminação ambiental. Estes elementos estão envolvidos em importantes reações enzimáticas, mas quando presentes em altas concentrações são considerados tóxicos (Lemos et al. 2013; Moura et al. 2018). Os acantocéfalos mostraram ser mais sensíveis na detecção de Zn e Cu que os peixes, podendo ser considerados promissores sentinelas para monitoramento ambiental na região.

A técnica do MEV-EDS tem se mostrado uma ferramenta útil e versátil para detectar elementos traço mesmo em baixas concentrações em diferentes tipos de amostras (Scimeca et al. 2014). Apesar de Scimeca et al. (2018) ressaltarem várias vantagens da técnica, a avaliação dos elementos neste estudo foi apenas semiquantitativa, não inferindo um valor quantitativo exato que possibilite calcular o fator de bioacumulação preconizado por Sures et al. (1999) (concentração no parasito/nos tecidos do hospedeiro). Este fator de bioacumulação seria também interessante para avaliar o tempo em que o parasito e hospedeiro foram expostos aos elementos, tendo em vista que a bioacumulação na musculatura demora mais tempo para ser detectada (Thielen et al. 2004).

Neste trabalho, a primeira a utilização do MEV-EDS em acantocéfalos e tecidos de peixes marinhos evidenciou resultados promissores na identificação de elementos traço essenciais e não essenciais. A comparação com os elementos traço ligados à condição ambiental da Baía de Guanabara mostrou o uso de *Dollfusentis* n. sp. de *O. ruber* como promissor sentinela de ecossistema marinho na região.

6 CONCLUSÕES

1. O estudo taxonômico integrativo dos acantocéfalos de *O. ruber* possibilitou a proposição de uma nova espécie do gênero *Dollfusentis* a partir de dados morfológicos, ultraestruturais e moleculares.
2. Novos dados ultraestruturais, genéticos e filogenéticos diferenciam *Dollfusentis* n. sp. do Rio de Janeiro de *Dollfusentis bravoae* do México, confirmando a inserção do gênero na família Illiosentidae.
3. A técnica do MV-EDS foi considerada eficiente pois possibilitou a identificação de 15 elementos traço essenciais e não essenciais tanto nas três regiões dos acantocéfalos quanto na musculatura, fígado e brânquias *O. ruber*.
4. Nos acantocéfalos, os elementos Ca, Mg e Si encontrados em todas as regiões dos acantocéfalos podem estar relacionados a alta capacidade de contração característica dos parasitos.
5. A comparação dos elementos traço essenciais reforçou a dinâmica de interação parasito-hospedeiro na captação por nutrientes, onde Si, Zn e Cu foram mais prevalentes nos parasitos enquanto Mg, P, K, Ca e Fe foram mais significativos nos peixes.
6. A detecção do Al que não é um elemento essencial, tanto nos acantocéfalos quanto nos peixes pode estar associada a uma contaminação ambiental regional.
7. Os acantocéfalos mostraram ser mais sensíveis na detecção de Zn e Cu que são relacionados a revestimentos anti-incrustantes e pinturas de barcos, podendo ser considerados promissores sentinelas para monitoramento ambiental na região.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abele LG, Gilchrist S. Homosexual rape and sexual selection in acanthocephalan worms. *Science*. 1977; 197(4298), pp.81-83.

Abreu IM, Cordeiro RC, Soares-Gomes A, Abessa DM, Maranhão LA, Santelli RE. Ecological risk evaluation of sediment metals in a tropical Eutrophic Bay, Guanabara Bay, Southeast Atlantic. *Marine pollution bulletin*. 2016 Aug 15;109(1):435-45.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990; doi: 10.1016/s0022-2836(05)80360-2.

Alves DR, Luque JL. Community Ecology of the Metazoan Parasites of White Croaker, *Micropogonias furnieri* (Osteichthyes: Sciaenidae), from the Coastal Zone of the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001. doi:10.1590/S0074-02762001000200002

Amin O. Classification of the Acanthocephala. *Folia Parasitol*. 2013. doi:10.14411/fp.2013.031.

Amin O. Classification. In: Crompton DW, Crompton DW, Nickol BB, editors. *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press; 1985.

Amin O. Marine Flora and Fauna of the Eastern United States. *Acanthocephala*. NOAA. 1998;1–28.

Amin OM. Key to the families and subfamilies of Acanthocephala, with the erection of a new class (Polyacanthocephala) and a new order (Polyacanthorhynchida). *The Journal of parasitology*. 1987 Dec 1:1216-9.

Authman MMN, Zaki MS, Khallaf EA, Abbas HH. Use of fish as Bio-indicator of the effects of Heavy Metal Pollution. *Aquac Res Development* 2015; 6: 328

Baker AR, Jickells TD. Atmospheric deposition of soluble trace elements along the Atlantic Meridional Transect (AMT). *Progress in Oceanography*. 2017; 158: 41-51.

Baptista-Neto JA, Gingele FX, Leipe T, Brehme I. Spatial distribution of heavy metals in surficial sediments from Guanabara Bay: Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Geology*. 2006 Apr 1;49(7):1051-63.

Barus V, Tenora F, Sumbera R. Relative concentrations of four heavy metals in the parasites *Protospirura muricola* (Nematoda) and *Inermicapsifer arvicanthidis* (Cestoda) in their definitive host silvery mole-rat (*Heliophobius argenteocinereus*: Rodentia). *Helminthologia*. 2003;40(March):227–32.

Bashirullah AK, Diaz MT. Temporal distribution and population structure of two congeneric species of *Cucullanus* (Nematoda: Cucullanidae) in *Orthopristis ruber* in Venezuela. *J Helminthol* 2008; 82: 69–76.

Bertucci F, Ruppe L, Van Wassenbergh S, Compere P, Parmentier E. New insights into the role of the pharyngeal jaw apparatus in the sound-producing mechanism of *Haemulon flavolineatum* (Haemulidae). *J Exp Biol.* 2014. doi:10.1242/jeb.109025

Brázová T, Hanzelová V, Miklisová D, Šalamún P, Vidal-Martínez VM. Host-parasite relationships as determinants of heavy metal concentrations in perch (*Perca fluviatilis*) and its intestinal parasite infection. *Ecotoxicology and environmental safety.* 2015;. 122, 551-556.

Brázová T, Poddubnaya LG, Miss NR, Hanzelová V. Ultrastructure and chemical composition of the proboscis hooks of *Acanthocephalus lucii* (Müller, 1776) (Acanthocephala: Palaeacanthocephala) using X-ray elemental analysis. *Folia Parasitol.* 2014; 61(6):549–57.

Buckner RL, Overstreet RM, Heard RW. Intermediate host for *Tegorhynchus furcatus* and *Dollfusentis chandleri* (Acanthocephala). *Proc. Helm. Soc. Wash.* 1978

Bullock WL, Mateo E. A reconsideration of the acanthocephalan genera: *Telosentis*, *Illiosentis* and *Tegorhynchus* on the basis of the type specimens. *J Parasitol.* 1970.

Buron I, James E, Riggs-Gelasco PJ, Ringwood AH, Rolando E, Richardson D. Overview of the status of heavy metal accumulation by helminths with a note on the use of in vitro culture of adult acanthocephalans to study the mechanisms of bioaccumulation. *Neotropical Helminthology.* 2009;3(2):101-10.

Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. *Parasitology On Its Own Terms: Margolis et al. Revised.* *J. Parasitol* 1997; 83: 575–583.

Chandler AC. A revision of the genus *Rhadinorhynchus* (Acanthocephala) with descriptions of new genera and species. *Parasit.* 1934; 26 (3): 352-358.

Chen H, Chen R, Teng Y, Wu J. Contamination characteristics, ecological risk and source identification of trace metals in sediments of the Le'an River (China). *Ecotoxicology and environmental safety.* 2016 Mar 1;125:85-92.

Coutinho FH, Silveira CB, Pinto LH, Salloto GR, Cardoso AM, Martins OB, Vieira RP, Clementino MM. Antibiotic resistance is widespread in urban aquatic environments of Rio de Janeiro, Brazil. *Microbial ecology.* 2014 Oct 1;68(3):441-52.

Dayrat B. Towards integrative taxonomy. *Biological journal of the Linnean society*. 2005;85(3):407-17.

de Carvalho AVM, Abuchacra PFF, Neto JAB, de Oliveira AS. Environmental assessment concerning trace metals and ecological risks at Guanabara Bay, RJ, Brazil. *Environ Monit Assess*. 2018; 190(8).

de Carvalho AVM, de Lima MN, Abuchacra RC, Abuchacra PFF, Neto JAB, Borges HV, et al. Ecological risks of trace metals in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil: An index analysis approach. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2016; 133:306–15. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.012

Fistarol GO, Coutinho FH, Moreira APB, Venas T, Cánovas A, Paula Jr SEM, Coutinho R, Moura RL, Valentin JL, Tenenbaum DR, Paranhos R, Valle RAB, Vicente ACP, Amado Filho GM, Pereira RC, Kruger R, Rezende CE, Thompson CC, Salomon OS, Thompson FL. Environmental and Sanitary Conditions of Guanabara Bay, Rio de Janeiro. *Front. Microbiol* 2015; 6: 1232.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 1994. doi:10.1371/journal.pone.0013102

Froese R, Pauly D. Fishbase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org [homepage on the Internet]. [updated ver. 06/2018; cited 2018 March 10]. Disponível em: <http://www.fishbase.org/search.php>.

García-Prieto L, Garcia-Varela M, Mendoza-Garfias B, De León GPP. Checklist of the acanthocephala in wildlife vertebrates of Mexico. *Zootaxa*. 2010.

García-Varela M, Pérez-Ponce de León G. Validating the systematic position of *Profilicollis* Meyer, 1931 and *Hexaglandula* Petrochenko, 1950 (Acanthocephala: Polymorphidae) using cytochrome c oxidase (Cox 1). *J Parasitol*. 2008; doi:10.1645/GE-1257.1.

Garey JR, Near TJ, Nonnemacher MR, Nadler SA. Molecular evidence for Acanthocephala as a subtaxon of Rotifera. *J Mol Evol*. 1996; doi:10.1007/BF02338837.

Gilbert BM, Avenant-Oldewage A. Trace element biomineralisation in the carapace in male and female *Argulus japonicus*. *PLoS One*. 2018; 13(6), e0197804.

Golvan YJ. Systematique des acanthocephales (Acanthocephala Rudolphi, 1801). Part I. L'ordes des Palaeacanthocephala Meyer, 1931. Volume 1. La superfamilille des Echinorhynchoidea (Cobbold, 1876) Golvan et Houin, 1963, Mémoires Du Muséum Natl. d'Histoire Nat. 1969.

Gonçalves MLC, Araújo A, Ferreira LF. Human Intestinal Parasites in the Past: New Findings and a Review. Mem. Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98 (Suppl 1): 103-118.

Hassouna N, Mithot B, Bachellerie JP. The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes, Nucleic Acids Res. 1984. doi:10.1093/nar/12.8.3563.

Heckmann RA, Amin OM, Standing MD. Chemical analysis of metals in acanthocephalans using energy dispersive x-ray analysis (EDXA) in conjunction with a scanning electron microscope (SEM). Comp Parasitol. 2007;74(2):388–91.

Irena VS, Damir V, Damir K, Zrinka D, Emil G, Helena Ć, et al. Molecular characterisation and infection dynamics of *Dentitruncus truttae* from trout (*Salmo trutta* and *Oncorhynchus mykiss*) in Krka River, Croatia. Vet Parasitol. 2013; doi:10.1016/j.vetpar.2013.07.014.

Kehrig HA, Malm O, Palermo EFA, Seixas TG, Baêta AP, Moreira I. Bioconcentração e Biomagnificação de Metilmercúrio na Baía de Guanabara. Quim. Nova. 2011; 34(3): 377-384

Kehrig HA, Seixas TG, Baêta AP, Malm O, Moreira I. Inorganic and methylmercury: Do they transfer along a tropical coastal food web? Mar Pollut Bull. 2010; doi:10.1016/j.marpolbul.2010.08.010.

Kennedy CR. Ecology of the Acanthocephala. New York: Cambridge University Press; 2006.

Koelreuther JT. Descriptio cyprini rutili quem halawel russi vocant historicoanatomica. Nov. Comment. Ac. Sci. Petrol. 1977; 15:494-503.

Kohn A, Macedo B. First record of *Aspicularis tetraptera* (Nitzsch, 1821) (Nematoda: Oxyuroidea) and *Dollfusentis chandleri* (Golvan, 1969) (Acanthocephala: Illiosentidae) in *Haemulon sciurus* (Shaw 1803) (Pisces: Pomadasyidae), Ann. Parasitol. Hum. Comp. 1984; 477–482.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol. 2016; doi:10.1093/molbev/msw054.

Leite LAR, Pedro NHO, Azevedo RK, Kinoshita A, Gennari RF, Watanabe S, Abdallah VD. *Contraecum* sp. Parasitizing *Acestrorhynchus lacustris* as a bioindicator for metal pollution in the Batalha River, southeast Brazil. Sci Total Environ 2016: 1-5.

Lemos LS, Moura JF, Hauser-Davis RA, Campos RC, Siciliano S. Small cetaceans found stranded or accidentally captured in southeastern Brazil: Bioindicators of essential and non-essential trace elements in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2013; 97, 166-175.

Luque JL, Amato JFR, Takemoto RM. Comparative analysis of communities of metazoan parasites of *Orthopristis ruber* and *Haemulon steindachneri* (Osteichthyes: Haemulidae) from the southeastern Brazilian littoral: I- structure and influence of the size and sex of host. *Rev. Brasil. Biol.* 1996.

Luton K, Walker D, Blair D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea), *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992; 56, 323–327. doi:10.1016/0166-6851(92)90181-I.

Mathison BA, Bishop HS, Sanborn CR, dos Santos Souza S, Bradbury R. *Macracanthorhynchus ingens* Infection in an 18-Month-Old Child in Florida: A Case Report and Review of Acanthocephaliasis in Humans. *Clinical Infectious Diseases*. 2016 Aug 7;63(10):1357-9.

Menezes NA, Figueiredo JL. *Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil*. Museu de Zoologia, Universidade São Paulo, 1980.

Miller DM, Dunagan TT. Functional morphology. In: Crompton DW, Crompton DW, Nickol BB, editors. *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press; 1985.

Monks S, Alemán-García B, Pulido-Flores G. A new species of *Dollfusentis* Golvan, 1969 (Palaeacanthocephala: Illiosentidae) in the striped mojará, *Eugerres plumieri* (Perciformes: Actinopterygii), from Bahía de Chetumal, Quintana Roo, Mexico. *Zootaxa*. 2008.

Monks S, Pulido-Flores G. Reevaluation and emended diagnosis of *Illiosentis* and *I. heteracanthus* (Acanthocephala: Illiosentidae). *J Parasitol.* 2002; doi:10.1645/0022-3395(2002)088[0365:RAEDOI]2.0.CO;2.

Morais AM, Malta JCO. Chemical Analysis through “Energy- Dispersive Spectroscopy (EDS)” of Digenea metacercariae found infesting specimens of *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) (Siluriformes: Callichthyidae) captured in Manaus polluted Igarapés. *Neotrop. Helminthol.* 2014; 8(2): 217-225.

Moura JF, Tavares DC, Lemos LS, Acevedo-Trejos E, Saint’Pierre TD, Siciliano S, et al. Interspecific variation of essential and non-essential trace elements in sympatric seabirds. *Environ Pollut.* 2018; 242, 470-479.

Nachev M, Sures B. Environmental parasitology: Parasites as accumulation bioindicators in the marine environment. *J Sea Res* 2016; 113: 45–50.

Noronha D., Vicente JJ., Pinto RM., de Fabio S. *Gorgorhynchus trachinotus* n. sp. and new host records for *Dollfusentis chandleri* Golvan, 1969 (Palaeacanthocephala, Echinorhynchoidea), *Mem. Inst Oswaldo Cruz*. 1986. doi:10.1590/S0074-02761986000200002.

Pereira Jr J, da Silva RZ. Acanthocephala. In: Parasitos de peixes marinhos da América do Sul. Jorge C. Eiras, Ana Luiza Velloso & Joaber Pereira Jr. Rio Grande: Ed. da FURG, 2017.

Perkins SL, Martinsen ES, Falk BG. Do molecules matter more than morphology? Promises and pitfalls in parasites. *Parasitology*. 2011; doi:10.1017/S0031182011000679.

Pessoa SB, Martins AV. Parasitologia médica. Guanabara Koogan; Rio de Janeiro 1982. 1002 p. 11 Ed.

Pinacho-Pinacho CD, Ponce de León GP, García-Varela M. Description of a new species of *Neoechinorhynchus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) a parasite of *Dormitator latifrons* from Southwestern Mexico based on morphological and molecular characters, *Parasitol. Int.* 2012. doi:10.1016/j.parint.2012.06.006.

Redi F. Osservazioni Interna Agli Animali Viventi che si Trovano Regli Animali Viventi. Firenze, 1684; 253 pp.

Rudolphi CA. Entozoorum sive vermium intestinalium historia naturalis. 1808-1809. Vol. I, XXVI+ 527 PP.; Vol. 2 257 pp. Amstelaedami.

Salgado-Maldonado G, Amin O. Acanthocephala of the Gulf of Mexico. In: D.L. Felder and D.K. Camp (Eds.), Gulf of Mexico. Origin, Waters, and Biota. Vol. 1, Biodiversity. Texas University Press, Corpus Christi, Texas, 2009: pp. 539–552.

Salgado-Maldonado G. Acantocéfalos de peces III. Redescrición de *Dollfusentis chandleri* Golvan, 1969 (Acanthocephala: Illiosentidae) y descripción de una nueva especie del mismo género, *An. Del Inst. Biol. Univ. Nac. Autónoma México, Ser. Zool.* 47. 1976; 19–34.

Sánchez TA, González-Ortegón E, Duarte CM. Trace metal partitioning in the top meter of the ocean. *Sci Total Environ*. 2019; 652, 907-914.

Santos CP, Carbonel HCAA. The role of physical factors in the distribution of the Monogenean fauna in the midwestern and southwestern Atlantic. In: Salgado Maldonado G, García Aldrete NA, Vidal-Martínez VM (Eds). Metazoan parasites in the

neotropics: a systematic and ecological perspective. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); 2000. pp.61-75.

Santos CP, Gibson DI, Tavares LER, Luque JL. Checklist of Acanthocephala associated with the fishes of Brazil. *Zootaxa*, 2008; 22:5326.

Santos CP, Machado PM, Santos EGN. Acanthocephala. In: Pavanelli GC, Takemoto RM, Eiras JC. *Parasitologia de peixes de água doce do Brasil*. Maringá: Eduem, 2013. p. 353-370.

Santos EGN, Chame M, Chagas-Moutinho VA, Santos CP. Morphology and molecular analysis of *Oncicola venezuelensis* (Acanthocephala: Oligacanthorhynchidae) from the ocelot *Leopardus pardalis* in Brazil. *J Helminthol*. 2016. doi:10.1017/S0022149X16000651

Schludermann C, Konecny R, Laimgruber S, Lewis JW, Schiemer F, Chovanec A, Sures B. Fish macroparasites as indicators of heavy metal pollution in river sites in Austria. *Parasitology* 2003; 126: 61–69.

Scimeca M, Orlandi A, Terrenato I, Bischetti S, Bonanno E. Assessment of metal contaminants in non-small cell lung cancer by EDX microanalysis. *Eur J Histochem*. 2014

Scimeca M, Bischetti S, Lamsira HK, Bonfiglio R, Bonanno E. Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *Eur J Histochem*. 2018; 62(1).

Soares-Gomes A, da Gama BA, Neto JB, Freire DG, Cordeiro RC, Machado W, Bernardes MC, Coutinho R, Thompson FL, Pereira RC. An environmental overview of Guanabara Bay, Rio de Janeiro. *Regional Studies in Marine Science*. 2016; 8:319-30.

Soares-Gomes A, Neves RL, Aucélio R, Van Der Ven PH, Pitombo FB, Mendes CL, Ziolli RL. Changes and variations of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in fish, barnacles and crabs following an oil spill in a mangrove of Guanabara Bay, Southeast Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 2010 Aug 1;60(8):1359-63.

Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 2006. doi:10.1093/bioinformatics/btl446.

Steinauer ML, Nickol BB, Ortí G. Cryptic speciation and patterns of phenotypic variation of a highly variable acanthocephalan parasite. *Mol Ecol*. 2007; doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03462.x.

Stolyar OB, Loumbourdis NS, Falfushinska HI, Romanchuk LD. Comparison of Metal Bioavailability in Frogs from Urban and Rural Sites of Western Ukraine. Arch Environ Contam Toxicol 2008; 54: 107-113

Sures B, Nachev M, Selbach C, Marcogliese DJ. Parasite responses to pollution: what we know and where we go in 'Environmental Parasitology'. Parasites & Vectors 2017; 10:65: 1-19

Sures B, Taraschewski H, Jackwerth E. Comparative study of lead accumulation in different organs of perch (*Perca fluviatilis*) and its intestinal parasite *Acanthocephalus lucii*. Bulletin of environmental contamination and toxicology. 1994(b) Feb 1;52(2):269-73.

Sures B, Taraschewski H, Jackwerth E. Lead accumulation in *Pomphorhynchus laevis* and its host. J. Parasitol 1994 (a); 80(3): 355-357.

Sures B, Taraschewski H, Jackwerth E. Lead content of *Paratenuisentis ambiguus* (Acanthocephala), *Anguillicola crassus* (Nematodes) and their host *Anguilla anguilla*. Diseases of aquatic Organisms. 1994 (c);1 9(2):105-7.

Sures B, Taraschewski H, Rokicki J. Lead and cadmium content of two cestodes, *Monobothrium wagneri* and *Bothriocephalus scorpii*, and their fish hosts. Parasitology Research. 1997 (a) Jun 1;83(6):618-23.

Sures B, Taraschewski H, Rydlo M. Intestinal Fish Parasites as Heavy Metal Bioindicators: A Comparison Between *Acanthocephalus lucii* (Palaeacanthocephala) and the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*. Environ Contam Toxicol 1997 (b); 59: 14-21.

Sures B, Taraschewski H. Cadmium concentrations in two adult acanthocephalans, *Pomphorhynchus laevis* and *Acanthocephalus lucii*, as compared with their fish hosts and cadmium and lead levels in larvae of *A. lucii* as compared with their crustacean host. Parasitology Research. 1995 Jun 1;81(6):494-7.

Sures B. Accumulation of heavy metals by intestinal helminths in fish: an overview and perspective. Parasitol 2003; 126: 53–60.

Szpilman M. Peixes marinhos do Brasil: guia prático de identificação. Mauad Editora Ltda, 2000.

Tellez M, Merchant M. Biomonitoring heavy metal pollution using an aquatic apex predator, the American alligator, and its parasites. PloS one. 2015 Nov 10;10(11):e0142522.

Thielen F, Zimmermann S, Baska F, Taraschewski H, Sures B. The intestinal parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) from barbel as a bioindicator for

metal pollution in the Danube River near Budapest, Hungary. *Environ Pollut* 2004; 129: 421–429.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; (22) 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673

Van Cleave HJ, Bullock WL. Morphology of *Neoechinorhynchus emydis*, a typical representative of the Eoacanthocephala. I. The praesoma. *Transactions of the American Microscopical Society.* 1950; 69, 288-303.

Van Cleave HJ. Expanding horizons in the recognition of a phylum. *J. Parasitol.* 1948; 34: 1–20.

Van Cleave HJ. Hook patterns on the acanthocephalan proboscis. *The Quarterly Review of Biology* 1941; 16(2), pp.157-172.

Verweyen L, Klimpel S, Palm HW. Molecular Phylogeny of the Acanthocephala (Class Palaeacanthocephala) with a Paraphyletic Assemblage of the Orders Polymorphida and Echinorhynchida. *PLoS ONE* 2011; 6(12): e28285.

Will KW, Mishler BD, Wheeler QD. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic biology.* 2005; 1;54(5):844-51.

Yamaguti S. *Systema Helminthum.* Volume 5-Acanthocephala. Interscience Publishers, New York. 423pp; 1963.

Zhou CC, Gao ZY, He YQ, Wu MQ, Chen F, Wang J, Liu JX, Yan CH. Effects of lead, mercury, aluminium and manganese co-exposure on the serum BDNF concentration of pre-school children in Taizhou, China. *Chemosphere.* 2019. 217:158-65.

Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal Chim Acta* 2008; 606: 135–150.

Zimmermann S, Sures B, Taraschewski H. Experimental studies on lead accumulation in the eel-specific endoparasites *Anguillicola crassus* (Nematoda) and *Paratenuisentis ambiguus* (Acanthocephala) as compared with their host, *Anguilla anguilla*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 1999 Aug 1;37(2):190-5.

ANEXO



Integrative taxonomy reveals a new species of *Dollfusentis* (Acanthocephala: Illiosentidae), in *Orthopristis ruber* (Osteichthyes: Haemulidae) from Rio de Janeiro, Brazil

Lucas Keidel^a, Martín García-Varela^b, Beatriz Brener^c, Gerardo Pérez-Ponce de León^b, Cláudia Portes Santos^{a,*}

^a Laboratório de Avaliação e Promoção a Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^b Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México

^c Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Dollfusentis lenti n. sp.
Scanning electron microscopy
18S rDNA
ITS1
5.8S and ITS2
28S rDNA
COI mtDNA

ABSTRACT

The taxonomy of species of *Dollfusentis* is rather confused due to the overlap of morphological traits. The aim of this study was to follow an integrative taxonomy approach over the acanthocephalans collected from *Orthopristis ruber* in Brazil. *Dollfusentis lenti* n. sp. is described and is characterised by having an elongate trunk with spines sparsely distributed (largest 60–85 µm long) extending from the neck to almost reach the end of proboscis receptacle; additionally, the new species possesses a long proboscis with 12–14 longitudinal rows of 16–17 hooks each; 3–4 posterior hooks reduced in size, well-spaced from the eight ventrolateral crescent hooks, and lemnisci longer than proboscis receptacle. New sequences of 18S rDNA, ITS1, 5.8S and ITS2, 28S rDNA and COI mtDNA are provided. *Dollfusentis bravoae* is morphologically similar because it possesses the same number of proboscis hooks, although it differs by the size of testes and uterus and by having a higher number of trunk spines; additionally, new scanning electron micrographs and genetic data for both species support its distinction. Phylogenetic analysis obtained either with two nuclear genes or mitochondrial COI gene showed that *Dollfusentis* spp. belong to Illiosentidae, and the new species is yielded as the sister species of *D. bravoae*, with *D. chandleri* as the sister species of the latter two.

1. Introduction

The marine fish, *Orthopristis ruber* (Cuvier, 1830) (Haemulidae), commonly known as “grunt”, is widely distributed in the Western Atlantic and feeds mainly on invertebrate and small fishes in rocky and coralline seabeds [1–3]. During a parasitological survey on *O. ruber* off Rio de Janeiro coast, Brazil, specimens of acanthocephalans belonging to the genus *Dollfusentis* Golvan, 1969 were recovered from the intestine of their hosts. The genus *Dollfusentis* currently contains five valid species distributed in marine and brackish water fishes along the Atlantic coast of the Americas, most of them found in the Gulf of Mexico slope and the Caribbean Sea [4], although Amin [5] recognizes six species.

Previous reports of acanthocephalans parasitizing *O. ruber* in Brazil were listed in two checklists, indicating records of only two species, *Dollfusentis chandleri* Golvan, 1969 and *Serrasentis* sp. [6,7]. Considering the wide distribution of *D. chandleri* in marine fishes across the western

Atlantic Ocean between North and South America, it is possible to expect morphological and molecular differences among specimens, raising the possibility, that *D. chandleri* consists of more than one species. Therefore, the aim of this study was to follow an integrative taxonomy approach with regard to the acanthocephalans collected from *O. ruber* in Brazil, including morphological, scanning electron microscopy analysis, distributional and genetic data. We uncovered a new species of *Dollfusentis*, which is described herein.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and taxonomic identification

From 2015 to 2018, 109 specimens of *O. ruber* were collected by local fisherman at Guanabara Bay near Urca beach, Rio de Janeiro, Brazil, (22°56'39.4"S, 43°09'46.0"W). The fish were transported on ice

* Corresponding author at: Laboratório de Avaliação e Promoção a Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4.365, Manguinhos, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil.

E-mail address: cpsantos@ioc.fiocruz.br (C.P. Santos).

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.04.003>

Received 24 December 2018; Received in revised form 5 April 2019; Accepted 5 April 2019

Available online 08 April 2019

1383-5769/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.