

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

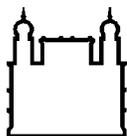
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

TAXONOMIA INTEGRADA DE NEMATÓIDES
ANISQUÍDEOS PARASITOS DE CETÁCEOS DA COSTA DO
NORDESTE DO BRASIL

Maria Isabel Nogueira Di Azevedo

Rio de Janeiro

2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Maria Isabel Nogueira Di Azevedo

Taxonomia integrada de nematóides anisauquídeos parasitos de cetáceos da costa do nordeste do Brasil.

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

Orientador: Dr^a Alena Mayo Iñiguez

Rio de Janeiro

2012

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

D536 Di Azevedo, Maria Isabel Nogueira

Taxonomia integrada de nematódeos anisquídeos parasitos de cetáceos da costa do nordeste do Brasil / Maria Isabel Nogueira Di Azevedo. – Rio de Janeiro, 2012.
xvii, 127 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2012.
Bibliografia: f. 110-127

1. Anisakis nascettii. 2. Anisakis paggiae. 3. Genes cox2. 4. Formalina. 5. Morfologia. 6. Genética. 7. Brasil – Nordeste. I. Título.

CDD 636.0896965

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Genética Molecular de Microorganismos, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob orientação da Dr^a Alena Mayo Iñiguez. Colaboraram para este projeto os Drs Marcelo Knoff, Delir C. Gomes e Nilza N. Felizardo do Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados (IOC) e Vitor L. Carvalho, da Associação de Pesquisa e Presevação de Ecossistemas Aquáticos (Ceará).

“Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez.”

Jean Cocteau

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora Alena, por todos os ensinamentos, paciência e dedicação, que muito vieram a enriquecer minha formação. Agradeço também pelo imenso carinho e amizade.

Aos pesquisadores do LHPV, Dr. Marcelo Knoff, Dr^a Delir Gomes e Dr^a Nilza Felizardo, pelo acolhimento na fase inicial do projeto e por todo suporte prestado durante esse tempo.

À Vitor Carvalho, pelo fornecimento das amostras e ajuda que nos deu sempre que requisitado.

À Dr^a Áurea Maria de Moraes, por permitir o uso do microscópio de seu laboratório para análise morfológica.

À Dr^a Ana Carolina Paulo Vicente, pela possibilidade de desenvolvimento do projeto no Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos e aos colegas que lá trabalham.

Agradeço à Pós Graduação em Biologia Parasitária, pelo suporte e excelentes disciplinas que forneceu.

Obrigada à Lauren, por toda ajuda que me prestou no laboratório durante o desenvolvimento deste trabalho, e acima de tudo por sua amizade e descontração, que muito ajudaram a superar as adversidades.

Agradeço à minha família, que desde sempre depositou confiança em mim, incentivando e apoiando quaisquer que foram minhas escolhas, e que mesmo longe nunca deixaram de me passar carinho e muito amor, fundamentais para o caminho que tracei até aqui. Aos meus pais, irmãos e avós, muito obrigada.

Agradeço particularmente à minha avó Miriam, minha primeira professora e eterno exemplo de vida, que comigo morou nos três primeiros anos fora de casa, acreditando assiduamente que estudar de fato vale a pena.

Ao meu amigo André, pela amizade, carinho, apoio e momentos de alegria que me proporcionou. À Thamiris, pelo companheirismo, cumplicidade e incentivo durante esses dois anos.

Às minhas amigas de mestrado, Clarissa, Marcela e Thaysse, pelos momentos de aflição, desespero e descontração compartilhados durante as disciplinas, que acabaram por cativar um forte laço de amizade.

À todos vocês, muito obrigada!

RESUMO

Nematóides da família Anisakidae tem como principais representantes espécies dos gêneros *Anisakis* Dujardin, 1845, *Pseudoterranova* Krabbe, 1878 e *Contracaecum* Railliet e Henry, 1913. Apresentam um ciclo de vida indireto em ecossistemas aquáticos, tendo mamíferos marinhos como hospedeiros definitivos e peixes e crustáceos como hospedeiros intermediários, estando relacionado a quadros patológicos em ambos. O homem pode infectar-se ao ingerir o pescado de forma crua ou mal-cozida, e desenvolver uma patologia gastrointestinal denominada anisaquidose. A identificação acurada de anisaquídeos em qualquer estágio do ciclo de vida é crucial para o melhor entendimento da ecologia e epidemiologia destes nematódeos, assim como para o diagnóstico e controle da anisaquíase humana e monitoramento da qualidade do pescado. A identificação em nível de espécie baseado na morfologia é difícil, devido aos limitados caracteres de importância taxonômica. Abordagens moleculares e genéticas são capazes de fornecer uma identificação precisa dos anisaquídeos, possibilitando um melhor entendimento de sua sistemática. O objetivo deste trabalho é identificar, através da taxonomia integrada com base em análises morfológica e genética, as espécies de nematódeos da família Anisakidae parasitos de mamíferos marinhos provenientes do litoral do nordeste brasileiro. Os parasitos (n=195) foram coletados de 54 cetáceos encalhados ao longo do litoral de seis estados do nordeste do Brasil. A análise morfológica revelou 60 espécimes como sendo *Anisakis* sp. clado I, 24 *Anisakis* sp. clado II e 4 como *Pseudoterranova* sp. A espécie *A. paggiae* foi identificada em *Kogiabreviceps*, constituindo a primeira descrição austral da espécie. O gênero *Pseudoterranova* é identificado pela primeira vez infectando o golfinho-rotator, *Stenella longirostris*. Devido à natureza do material, fixado em formalina, etanol, ou AFA, diferentes métodos e kits de extração de DNA foram empregados, e a metodologia de pré-tratamento com CTAB e extração com o kit comercial QIAamp® DNA Investigator (Qiagen) apresentou o melhor desempenho. Para amplificação do DNA, a técnica de Polimerização Reconstrutora se mostrou eficaz na otimização da PCR. O gene mtDNA *cox2* foi avaliado como *barcode* da família Anisakidae e se mostrou eficiente. Dezesesseis espécimes, de hospedeiros distintos, foram geneticamente identificados como *A. typica*, confirmando esta espécie como a mais circulante no Brasil. Em *Stenella frontalis*, *Lagenodelphis hosei* e *Globicephala macrorhynchus*, a espécie é relatada pela primeira vez em águas do litoral brasileiro. A espécie *A. nascettii* foi identificada em um hospedeiro ainda não relatado, *Mesoplodon europaus*, a baleia bicuda de Gervais, e sua distribuição também expandida para águas do Atlântico sudoeste.

Palavras-chave: *Anisakis nascettii*, *Anisakis paggiae*, *cox2*, Nordeste Brasil, formalina, morfologia, genética.

ABSTRACT

Anisakids are mainly represented by species of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845, *Pseudoterranova* Krabbe, 1878 e *Contracaecum* Railliet and Henry, 1913. They display indirect life cycles in aquatic ecosystems. Marine mammals act as definitive hosts and fishes as intermediate hosts, being anisakids associated to pathological conditions on both. Human can become infected when ingesting raw or undercooked seafood, acquiring anisakidosis. The accurate identification of anisakids at any life cycle stage is crucial for better understanding the ecology and epidemiology of these nematodes, as well for diagnosis and control of human anisakidosis and monitoring the seafood quality. Identification at species level based on morphology is difficulty, due to limited characters of taxonomic importance. Molecular and genetic approaches are able to provide a precise identification of anisakids, enabling a better knowledge about their systematics. The objective of the present study was to identify, through the integrated taxonomy based on morphological and genetic data, the nematodes species of the Anisakidae family, parasites of marine mammals caught on the northeastern coast off Brazil. Parasites (n=195) were collected from 57 cetaceans stranded along the coast of six states of the Northeastern of Brazil. Morphological analysis revealed 60 specimens as *Anisakis* sp. clade I, 24 as *Anisakis* sp. clade II e 4 as *Pseudoterranova* sp. The species *A. paggiae* was identified in *K. breviceps*, constituting the first austral description of the species. The genera *Pseudoterranova* was identified for the first time infecting the spinner-dolphin, *Stenella longirostris*. Due to material conditions, fixed in formalin, ethanol or AFA, different methods and extractions kits were applied, and the pre-treatment with CTAB solution and posterior extraction with the commercial kit comercial *QIAamp® DNA Investigator* (Qiagen), showed the best performance. For DNA amplification, the Reconstructive Polymerization method was efficient in PCR optimization. The gene mtDNA *cox2* was evaluated as *barcode* to Anisakidae and it was effective. Sixteen specimens, from different hosts, were genetically identified as *A. typica*, confirming this species as the most circulating in Brazil. In *Stenella frontalis*, *Lagenodelphis hosei* and *Globicephala macrorhyncus*, the species was reported for the first time in Brazilian waters. The species *A. nascettii* was identified in an unreported host, *Mesoplodon europaus*, the Gervais beaked whale, expanding its distribution to Southwest Atlantic waters.

Key-words: Anisakids, Cetaceans, Taxonomy, *Anisakis paggiae*, *Anisakis nascettii*, *cox2*, Northeastern Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Ciclo de vida de <i>Anisakis</i> sp.....	4
Figura 1.2. Morfologia básica dos gêneros <i>Anisakis</i> , <i>Pseudoterranova</i> e <i>Contracaecum</i>	6
Figura 1.3. Relações genéticas entre <i>Anisakis</i> spp inferidas por análise de aloenzimas e sequências do gene mtDNAcox2.....	10
Figura 1.4. Polimerização Reconstutora.....	11
Figura 4.1. Localização geográfica do encalhe dos cetáceos deste estudo e número de indivíduos cetáceos por estado.....	17
Figura 5.1: Registros fotográficos e desenhos de espécimes identificados como pertencentes ao clado I.....	34
Figura 5.2: Registros fotográficos e desenhos de espécimes identificados como pertencentes ao clado II.....	35
Figura 5.3: Registros fotográficos de larvas do tipo I (<i>sensu</i> Berland).....	36
Figura 5.4: Registros fotográficos de larvas do tipo II (<i>sensu</i> Berland).....	37
Figura 5.5: Registros fotográficos e desenhos de espécimes identificados como pertencentes ao gênero <i>Pseudoterranova</i>	38
Figura 5.6: Detalhes morfológicos dos espécimes identificados como <i>Anisakis paggiae</i>	39
Figura 5.7. Boxplot de comparação da eficiência dos diferentes métodos de extração utilizados neste estudo.....	41
Figura 5.8: Resultados da eletroforese em gel 2% dos produtos da PCR para o gene ITS2 (~500pb) com aplicação da PR.....	43
Figura 5.9: Resultados da eletroforese em gel 2% dos produtos da PCR purificados para o gene <i>cox2</i> (629pb).....	44

Figura 5.10. Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene <i>cox2</i> de <i>A. typica</i> e <i>A. nascettii</i> deste estudo (representadas por AV) com outras de <i>Anisakis</i> sp. retiradas do GenBank.	47
Figura 5.11. Comparação das sequências de aminoácidos do gene <i>cox2</i>	52
Figura 5.12: Distribuição das distâncias genéticas intraespecífica e interespecífica do gene <i>cox2</i> das sequências de <i>Anisakis</i> spp. disponíveis no banco e as das espécies identificadas neste estudo.....	55
Figura 5.13: Árvore filogenética Neighbour-Joining inferida a partir de sequências do gene <i>cox2</i> (n= 51) de <i>Anisakis</i> spp.....	56
Figura 5.14. Alinhamento das sequências nucleotídicas da região ITS de <i>A. nascettii</i> deste estudo (AV 56) com outras de <i>Anisakis</i> sp. retiradas do GenBank.....	58
Figura 5.15: Árvore filogenética Neighbour-Joining inferida a partir de sequências do da região ITS (n= 28) de <i>Anisakis</i> spp.....	62
Figura 5.16: Alinhamento das sequências nucleotídicas da região ITS-1 de <i>A. typica</i> deste estudo (AV) com outras de <i>Anisakis</i> sp. retiradas do GenBank.....	64
Figura 5.17: Árvore filogenética Neighbour-Joining inferida a partir de sequências do da região ITS-1 (n= 59) de <i>Anisakis</i> spp.....	68
Figura 5.18: Alinhamento das sequências nucleotídicas da região ITS-2 de <i>A. typica</i> deste estudo (AV 54) com outras de <i>Anisakis</i> sp. retiradas do GenBank.....	70
Figura 5.19: Árvore filogenética Neighbour-Joining inferida a partir de sequências do da região ITS-2 (n= 48) de <i>Anisakis</i> spp.....	73
Figura 5.20: Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene 18S rDNA de <i>A. nascettii</i> deste estudo (AV 56) com outras dos gêneros <i>Anisakis</i> , <i>Pseudoterranova</i> e <i>Contracaecum</i> retiradas do GenBank.....	75
Figura 5.21: Árvore filogenética Neighbour-Joining inferida a partir de sequências do gene 18S rDNA (n=9) de <i>Anisakis</i> spp., <i>Pseudoterranova</i> sp. e <i>Contracacaecum</i> spp.....	76
Figura 5.22: Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene <i>cox1</i> de <i>A. typica</i> deste estudo (AV 55) com outras de <i>Anisakis</i> sp. disponíveis no GenBank (08/2012).....	78

Figura 5.23. Árvore filogenética Neighbour-Joining inferida a partir de sequências do gene <i>cox1</i> (n= 17) <i>Anisakis</i> spp.....	79
Figura 6.1: Chave taxonômica original para identificação de <i>Anisakis</i> spp. do clado II descrita em Mattiucci et al.,2005.....	87
Figura 6.2: Localizações geográficas onde <i>A. paggiae</i> foi relatada até o momento.	89
Figura 6.3: Locais de encalhe dos cetáceos onde <i>A.paggiae</i> foi identificado no presente estudo.....	89
Figura 6.4. Localizações geográficas onde <i>A. nascettii</i> já foi relatado.....	99
Figura 6.5. Localizações geográficas onde <i>A. typica</i> já foi relatada.....	101
Figura 6.6. Locais de encalhe dos cetáceos onde <i>A. typica</i> foi identificado no Brasil.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Relação de espécimes de parasito por hospedeiro e localização geográfica do encalhe dos cetáceos.....	18
Tabela 4.2. Período de preservação (em anos) e conservante das amostras deste estudo.....	20
Tabela 4.3. Alvos genéticos e primers utilizados neste estudo.....	25
Tabela 5.1: Dados morfométricos dos espécimes sob avaliação morfológica neste estudo.....	33
Tabela 5.2: Concentrações de DNA (ng/μL) obtidas pelos diferentes métodos de extração de aplicados.	40
Tabela 5.3: Resultados da comparação de métodos de extração segundo o teste estatístico Post-hoc.....	41
Tabela 5.4: Concentrações de DNA das amostras extraídas neste estudo a partir do método de digestão com CTAB e extração com o Kit QIAamp® DNA Investigator...	42
Tabela 5.5. Distâncias genéticas entre as sequências do gene mtDNA <i>cox2</i> de <i>Anisakis</i> disponíveis no banco (n=247) e aquelas incluídas neste estudo (*).	54
Tabela 5.6: Distâncias genéticas entre as sequências da região ITS completa das espécies de <i>Anisakis</i> disponíveis no banco (n=441) e sequencia de <i>Anisakis nascettii</i> identificada neste estudo (*).	61
Tabela 5.7: Distâncias genéticas entre as sequências da região ITS-1 das espécies de <i>Anisakis</i> disponíveis no banco (n=441) e sequencia de <i>Anisakis typica</i> identificada neste estudo (*).	67
Tabela 5.8: Distâncias genéticas entre as sequências da região ITS-2 das espécies de <i>Anisakis</i> disponíveis no banco (n=441) e a sequência de <i>Anisakis typica</i> identificada neste estudo (*).	72
Tabela 5.9: Distâncias genéticas entre as sequências do gene 18S rDNA dos gêneros <i>Anisakis</i> sp. (n=6), <i>Pseudoterranova</i> sp. (n=1) e <i>Contracaecum</i> sp. (n=4) disponíveis no banco e a sequência de <i>A. nascettii</i> deste estudo (*).	76

Tabela 5.10: Distâncias genéticas entre as sequências do gene <i>cox1</i> disponíveis no banco (<i>A. simplex</i> 14, <i>A. pegreffii</i> 2, <i>A. physeteris</i> 1) e a sequência de <i>A. typica</i> deste estudo (*).....	79
Tabela 5.11. Resultados obtidos neste estudo a partir das análises morfológica e genética.....	82
Tabela 6.1: Hospedeiros definitivos e intermediários de <i>A. paggiae</i> e localizações geográficas relatados até o momento.....	88
Tabela 6.2: Hospedeiros cetáceos de <i>Pseudoterranova sp.</i> relatados até o momento.....	91
Tabela 6.3: Hospedeiros e localização geográfica de <i>A. nascetti</i> relatados até o momento.....	98
Tabela 6.4: Hospedeiros e localização geográfica de <i>A. typica</i> relatados até o momento.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

18S rDNA – gene DNA ribossomal 18S

28S rDNA - gene DNA ribossomal 28 S

AFA – Álcool/ Formaldeído/ Ácido acético

AQUASIS – Associação de Pesquisa e Presevação de Ecossistemas Aquáticos

ATL- *Animal Tissue Lysis*

BLAST- *Basic Local Alignment Search Tool*

BOLD: *Barcoding of Life Database*

CBOL: *Consortium for the Barcode of Life*

CDC- *Centers for Diseases Control*

CHIOC – Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz

cit b - Cytochrome b

cox 1- Cytochrome oxidase 1

cox 2- Cytochrome oxidase 2

CTAB- *Cetyltrimethylammonium bromide*

DCP- *Denticulate Caudal Plate*

DNA- *Deoxyribonucleic acid*

dNTP- *Deoxyribonucleotide*

DP – Desvio-Padrão

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ITS – *Internal Transcriber Spacer*

K2P – Kimura-2-Parâmetros

L2 – Segundo estágio larval

L3- Terceiro estágio larval

L4- Quarto estágio larval

MAE - *Multilocus Allozyme Electrophoresis*

mtDNA – DNA mitocontrial

NaCl – Cloreto de Sódio

NCBI- *National Center for Biotechnology Information*

NJ – *Neighbour- Joining*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PDTIS - Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde

PR – Polimerização Reconstutora

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RPM – Rotações por Minuto

SSCP - *Single Strand Conformation Polymorphism*

TAE - *Tris-Acetate-EDTA*

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Mamíferos marinhos, encalhe e parasitismo.....	2
1.2. Anisaquídeos.....	3
1.3. Identificação Morfológica de Anisaquídeos.....	6
1.4. Identificação Molecular de Anisaquídeos.....	7
1.5. Taxonomia do gênero <i>Anisakis</i>	9
1.6. Otimização da Extração e Amplificação do DNA a partir de amostras preservadas em soluções.....	11
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. Objetivo Geral.....	15
3.2. Objetivos Específicos.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1. Amostras.....	17
4.2. Análise Morfológica.....	20
4.3. Análise Genética.....	21
4.3.1. Extração de DNA	21
4.3.1.1. Pré-Tratamento de Extração – Digestão com CTAB.....	21
4.3.1.2. <i>QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen)</i>	22
4.3.1.3. <i>DNA IQ™ System (Promega)</i>	22
4.3.1.4. Método de Fenol:Clorofórmio.....	23
4.3.1.5. <i>QIAamp® DNA Investigator (Qiagen)</i>	23
4.3.2. Polimerização Reconstutora.....	23
4.3.3. PCR e Sequenciamento Nucleotídico.....	23
4.3.4. Análises de sequências, filogenética e de distâncias genéticas..	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1. Análise morfológica.....	28
5.1.1. Descrição morfológica dos espécimes.....	29
5.2. Extração de DNA.....	40
5.3. Polimerização Reconstutora.....	43
5.4. Amplificação do DNA e Análise de Sequências nucleotídicas.....	44
5.5. Análise Genética.....	44
5.5.1. Análise do gene mtDNA <i>cox2</i>	45
5.5.2. Análise da região ITS.....	55
5.5.3. Análise do gene 18S rDNA.....	74
5.5.4. Análise do gene mtDNA <i>cox1</i>	77
5.6. Depósitos de espécimes e de sequências.....	80

6. DISCUSSÃO.....	84
6.1. Distribuição dos cetáceos, encalhe e o estudo da fauna parasitária..	85
6.2. Análise Morfológica.....	86
6.2.1. Identificação morfológica de <i>Anisakis paggiae</i>	86
6.2.2. Identificação morfológica do gênero <i>Pseudoterranova</i>	90
6.3. Extração de DNA.....	92
6.4. Amplificação do DNA.....	93
6.5. Análise Genética.....	95
6.5.1. Identificação genética de <i>Anisakis nascettii</i>	97
6.5.2. Identificação genética de <i>Anisakis typica</i>	100
6.5.3. Avaliação do gene <i>cox2</i> como barcode de espécies de parasitos da família Anisakidae.....	105
7. CONCLUSÕES.....	107
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
9. ANEXO.....	128

1.INTRODUÇÃO

1.1) Mamíferos marinhos, encalhe e parasitismo

O termo “mamífero marinho” é apenas descritivo e não constitui uma designação taxonômica válida. Inclui as ordens Cetacea (baleias e golfinhos), Sirenia (peixe-boi e dugongo) e Carnivora (lontra do mar, urso polar, morsas, focas e leões marinhos) (Jefferson et al.,1993). A ordem Cetacea é constituída pelas subordens Mysticeti (baleias com barbatanas) e Odontoceti (baleias com dentes). Os mysticetos incluem as grandes baleias, como a baleia franca (*Balaena mysticetus*) e a baleia cinzenta (*Eschrichtius robustus*). Os odontocetes, conhecidos como “pequenos cetáceos”, são os mais abundantes dentro da ordem Cetacea, incluindo dez famílias, 38 gêneros e mais de 70 espécies (Culik, 2010).

O encalhamento de cetáceos ocorre em todo o mundo devido a uma série de motivos, que podem ser naturais ou antropogênicos. Dentre as causas naturais estão as doenças (Dhermain et al.,2002), erros de navegação devido à anormalidades no campo magnético da Terra (Bompar, 1996; Klinowska, 1991), eventos climáticos ou oceanográficos (Perrin e Geraci, 2002), escape de predadores (Nores e Perez, 1988) e perseguição de presa (Casinos e Vericad, 1976). Causas antropogênicas incluem colisões com embarcações (Laist et al., 2001; Jensen e Silber, 2003), poluição (Kannan et al.,1993; Meirelles e Barros, 2007) e emalramento com redes de pesca (Engel, 1994; Read et al.,2003). Os eventos de encalhamento podem fornecer uma série de informações, como distribuição e abundância de determinada espécie em uma dada localidade (Berrow, 2001) e o motivo de morte nestes animais, possibilitando o monitoramento e adoção de medidas proteção e controle de mortalidade (Mignucci-Gianonni et al.,1999; Norman et al., 2004).

As carcaças desses animais encalhados permitem ainda o estudo de sua fauna parasitária, que muitas das vezes podem estar envolvidas com a morbidade/mortalidade desses animais. Os agentes infecciosos que acometem os cetáceos incluem vírus (Kennedy-Stoskopf, 2001), bactérias (Dunn et al.,2001), fungos (Reidarson et al.,2001) e macroparasitas (Howard et al.,1983). Dentre os estes, os nematóides anisquídeos são dos mais prevalentes, sendo encontrados principalmente nos compartimentos estomacais, podendo provocar úlceras, e ocasionalmente edema e hemorragia (Geraci e Aubin, 1987; Dailey, 2001).

Até o momento, já existem relatos de parasitismo por anisaquídeos em oito famílias da ordem Cetacea (Balaenopteridae, Delphinidae, Kogiidae, Monodontidae, Neobalaenidae, Phocoenidae, Physeteridae e Ziphiidae) e duas da ordem Carnivora, subordem Pinippedia (Otariidae e Phocidae), totalizando mais de 40 espécies de mamíferos marinhos relatados como hospedeiros potenciais destes nematódeos (Mattiucci e Nascetti, 2008).

1.2) Anisaquídeos

Os nematódeos da família Anisakidae tem como principais representantes espécies dos gêneros *Anisakis* Dujardin, 1845, *Pseudoterranova* Krabbe, 1878 e *Contracaecum* Railliet e Henry, 1913. Apresentam um ciclo de vida indireto em ecossistemas aquáticos, envolvendo vários hospedeiros em diferentes níveis da cadeia alimentar (Mattiucci e Nascetti, 2008). Os hospedeiros definitivos consistem em mamíferos marinhos, principalmente cetáceos, parasitados em sua maioria por espécies do gênero *Anisakis*, e pinípedes, hospedeiros preferenciais dos gêneros *Pseudoterranova* e *Contracaecum*. Peixes, lulas e outros invertebrados marinhos atuam como hospedeiros intermediários ou paratênicos (Figura 1.1).

Nos peixes, os anisaquídeos estão associados a processos inflamatórios no pâncreas e no fígado (Hauck e May, 1977), e a lesões hemorrágicas na região anal (Beck et al.,2008; Noguera et al.,2008, 2009). A larva é geralmente encontrada nas vísceras do peixe, que são retiradas durante o processamento do pescado. Porém, algumas podem se alojar na musculatura, parte comestível do peixe, sendo a visualização a olho nu, por vezes, difícil (Abollo et al.,2001). Estes pescados infectados com larva L3 de anisaquídeos, uma vez consumidos pelo homem de forma crua ou mal cozida, podem vir a causar a enfermidade humana denominada anisaquíase (quando ocasionada por espécies do gênero *Anisakis*) ou anisaquidose (quando provocada por qualquer membro da família Anisakidae) (Kassai et al.,1988).

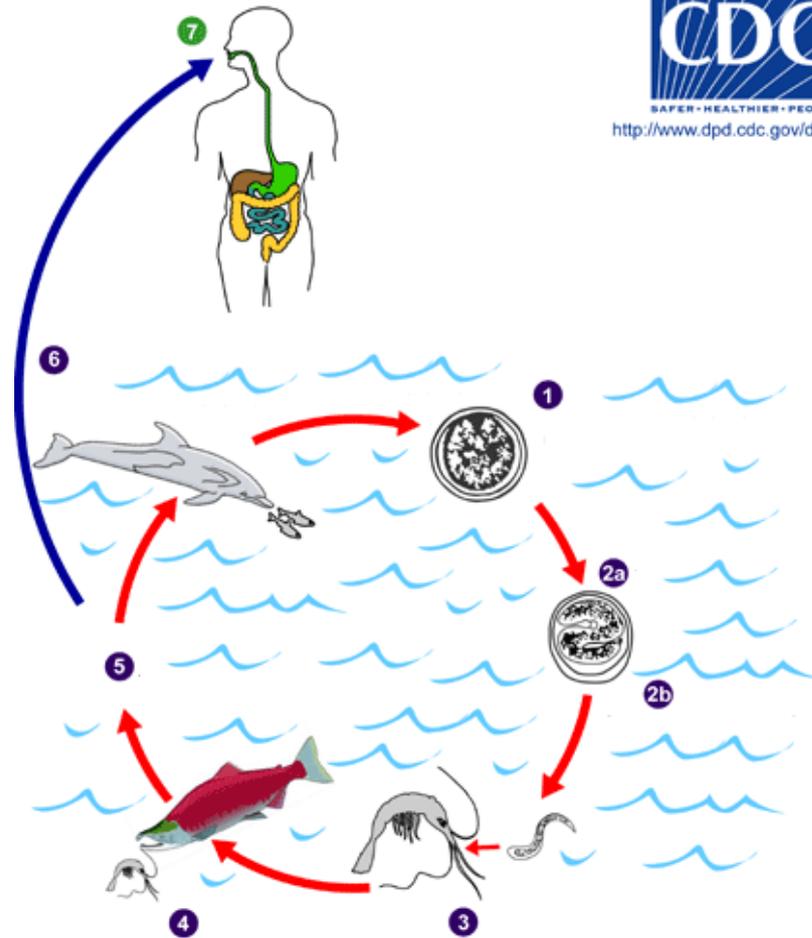


Figura 1.1. Ciclo de vida de *Anisakis* sp. 1- Mamíferos marinhos liberam ovos não embrionados; 2a- Ovos se tornam embrionados na água e uma larva L2 forma-se no ovo; 2b- Larva L2 sai do ovo e torna-se de vida livre; 3- Larvas de vida livre são ingeridas por crustáceos e maturam em larvas L3; 4- Crustáceos infectados são ingeridos por peixes e/ou lulas; 5- Peixes e lulas mantêm larvas L3, que são infectivas para mamíferos marinhos e humanos; 6- Quando peixes e lulas contendo larva L3 são ingeridos por mamíferos marinhos, as larvas desenvolvem-se em vermes adultos, que passam a liberar ovos nas fezes dos mamíferos, recomeçando o ciclo; 7- O homem se torna hospedeiro acidental ao ingerir peixes ou lulas crus ou malcozidos infectados com larva L3. Fonte: CDC, 2009.

As espécies mais comumente associadas às infecções humanas são *Anisakis simplex* sensu strictu (Gonzalez Quijada et al.,2005; Pellegrini et al.,2005; Umehara et al.,2007; Arizono et al.,2012;) e *Pseudoterranova decipiens* (Adams et al.,1997; Oshima, 1987; Pinel et al.,1996; Zvejnieks et al.,1998), com alguns poucos casos relatados provocados por *A. physeteris* (Asato et al.,1991; Clavel et al.,1993; Cabrera e Ognio, 2002), *A. pegreffii* (Umehara et al.,2007; Fumarola et al.,2009; Mattiucci et al.,2011) e *Contracaecum* spp. (Vidal-Martinez et al.,1994; Shamsi e Butcher, 2011). Apesar destes parasitas não desenvolverem ciclo de vida no homem, podem provocar um estado debilitante, caracterizado por dor abdominal, náusea, vômitos e febre, ou ainda levar a um quadro de hipersensibilidade grave pela exposição aos antígenos destes nematódeos, que acometem o indivíduo mesmo quando o pescado passa por processos de cozimento ou congelamento (Audicana e Kennedy, 2008).

Com o processo de globalização e o crescimento acelerado dos mercados internacionais, somado ao crescente aumento da popularidade de iguarias da culinária japonesa, peruana, entre outras, vem sido verificado aumento nos casos de anisquidose humana mesmo em países onde não existe tradição de consumo de peixe cru (Chai et al.,2005). A doença é endêmica no Japão, Espanha, Chile e Peru, mas existem casos registrados em países de todos os cinco continentes (Audicana e Kennedy, 2008). No Brasil, apesar de já relatadas ocorrência de larvas de anisquídeos em peixes teleósteos comercializados no litoral (Alves et al. 2002; Knoff et al., 2004; Padovani et al., 2005; Dias et al., 2010), a doença ainda não foi notificada, provavelmente por desconhecimento sobre a enfermidade e seu diagnóstico (Iñiguez et al., 2011).

Segundo os registros da Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), 33% dos helmintos parasitos de cetáceos da costa atlântica brasileira são nematóides, dos quais espécimes da família Anisakidae foram encontrados em todas as seis famílias de hospedeiros estudadas (Balaenopteridae, Delphinidae, Iniidae, Phocoenidae, Physeteridae e Pontoporidae). Entretanto, somente quatro espécies foram descritas no país com base em caracteres morfológicos: *A. insignis*, *A. physeteris*, *A. simplex* e *A. typica* (Knoff et al.,2011). Outros espécimes de anisquídeos tombados foram identificados somente como *Anisakis* sp., *Pseudoterranova* sp. e *Contracaecum* sp. (Luque et al. 2010). Até o momento, a

identificação genética tanto em estágios larvais como em adultos está limitada às espécies *A. typica* e *A. physeteris* (D'Amelio et al., 2000; Mattiucci et al., 2002; Iñiguez et al., 2009; et al., 2011; Borges et al., 2012).

1.3) Identificação Morfológica de Anisaquídeos

Basicamente, os três principais gêneros da família podem ser identificados morfológicamente como segue: nas espécies do gênero *Anisakis* estão ausentes o ceco intestinal e o apêndice ventricular (Figura 1.2A); no gênero *Pseudoterranova* está presente o ceco intestinal e ausente o apêndice ventricular (Figura 1.2B); e no gênero *Contracaecum* estão presentes o ceco intestinal e o apêndice ventricular (Figura 1.2C) (Olson et al., 1983).

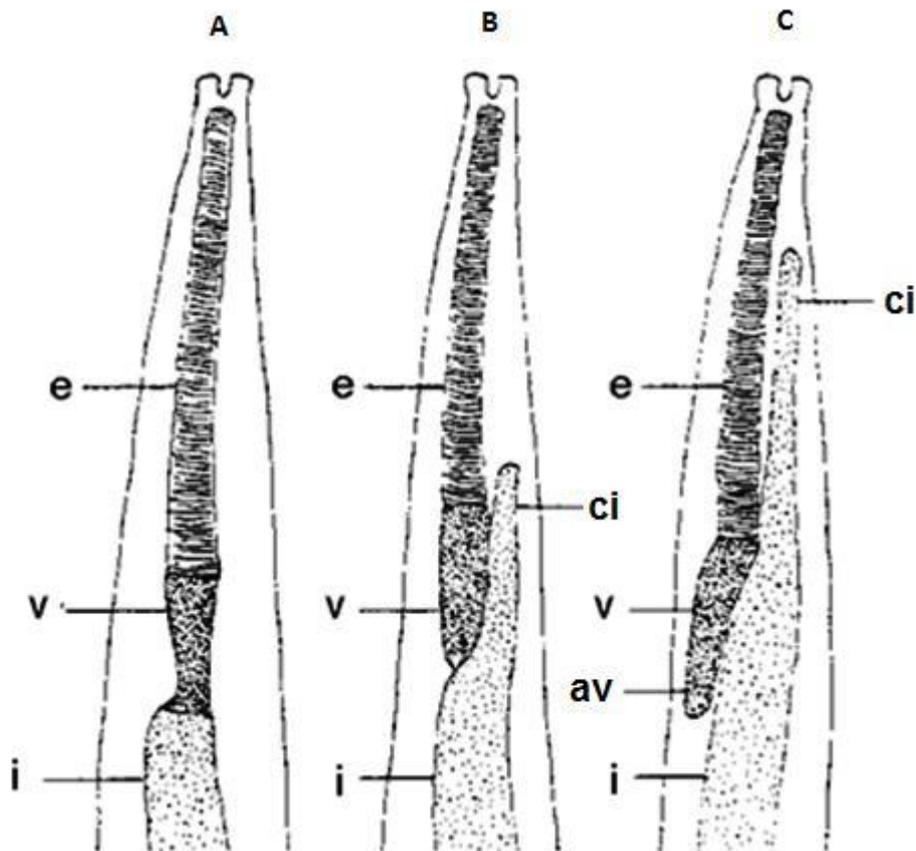


Figura 1.2. Morfologia básica dos gêneros *Anisakis* (A), *Pseudoterranova* (B) e *Contracaecum* (C). **e**) esôfago; **v**) ventrículo; **i**) intestino; **ci**) ceco intestinal; **av**) apêndice ventricular. Fonte: Olson et al., 1983.

A identificação em nível de espécie baseado na morfologia é difícil, devido à ausência ou número limitado caracteres morfológicos de importância taxonômica presentes nos estádios larvais e nas fêmeas, sendo apenas informativos em machos adultos (Mattiucci e Nascetti, 2008). Os caracteres morfológicos das chaves taxonômicas das espécies de anisaquídeos incluem o tamanho e forma do ventrículo, o padrão de distribuição das papilas caudais e o comprimento dos espículos (Davey, 1971).

No caso do gênero *Anisakis*, Berland (1961) classificou as larvas em dois tipos, I e II, baseado no comprimento do ventrículo e presença/ausência de mucron na cauda. Posteriormente, com análise morfológica dos vermes adultos, somada às inferências filogenéticas feitas a partir da aplicação de técnicas moleculares, foi possível identificar dois clados principais dentro do gênero (Orecchia et al., 1986; Mattiucci et al., 2007a). O clado I definido geneticamente inclui as espécies com o estágio larval tipo I (*sensu* Berland, 1961), com ventrículo sempre mais longo do que largo e espículos finos, longos e frequentemente de tamanhos diferentes. Já aquelas espécies incluídas no clado II apresentam estágio larval tipo II (*sensu* Berland, 1961), ventrículo curto (< 0.6 mm), e os espículos são robustos, curtos (<0.4 mm) e de tamanho similar (Mattiucci et al., 2005).

1.4) Identificação Molecular de Anisaquídeos

A identificação acurada de anisaquídeos em qualquer estágio do ciclo de vida é crucial para o melhor entendimento da ecologia e epidemiologia destes nematódeos, assim como para o diagnóstico e controle da anisaquidose humana e monitoramento da qualidade do pescado (Cavallero et al., 2012). Tendo em vista a dificuldade da identificação em nível de espécie baseado apenas na morfologia, nas últimas duas décadas abordagens moleculares e genéticas capazes de fornecer uma identificação precisa dos anisaquídeos, possibilitando um melhor entendimento de sua sistemática, vêm sendo aplicadas (Mattiucci et al., 1997; D'Amelio et al., 2000; Mattiucci e Nascetti, 2008).

A primeira abordagem aplicada com este intuito foi à técnica de eletroforese multilocus de aloenzimas (MAE), a partir da análise de 19 a 24 loci enzimáticos. Esta

ferramenta revelou a existência de elevada heterogeneidade genética dentro de algumas morfoespécies de anisquídeos e aumentou a diversidade de espécies pertencentes aos gêneros *Anisakis*, *Pseudoterranova* e *Contracaecum*, com a detecção de várias espécies-irmãs e de novas espécies (Arduino et al., 1995; Bullini et al., 1986; Mattiucci et al., 1986, 1997, 1998, 2001, 2002a, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007a, 2008a,b,c, Nascetti et al., 1986; Paggi et al., 1991, 1998b, 2000, 2001). Entretanto, a técnica é demorada, trabalhosa, de baixa reproductibilidade e por vezes pouco informativa.

Com a vantagem de serem mais rápidas, precisas e informativas, começaram a ser utilizadas técnicas de identificação baseadas no DNA. As metodologias derivadas da reação em cadeia da polimerase (PCR) para estudo da sistemática dos anisquídeos incluem o PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*) (D'Amelio et al., 2000; Kijewska et al., 2002; Pontes et al., 2005), o SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) (Zhu et al., 1998, 2000b, 2007), e o sequenciamento direto de amplicons dos genes ribossomais do genoma nuclear, 18S rDNA e 28S rDNA, da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Szostakowska et al., 2002; Hu et al., 2001; Li et al., 2005; Nadler et al., 2000, 2005; Zhu et al., 1998, 2000b, 2001, 2002) e dos genes mitocondriais citocromo oxidase b (*cit b*) (Mattiucci et al., 2003), citocromo oxidase 2 (*cox 2*) (Mattiucci e Nascetti, 2006; Mattiucci et al., 2008b, c; Valentini et al., 2006); e citocromo oxidase 1 (*cox 1*) (Umehara et al., 2008; Kijewska et al., 2009).

Atualmente vêm sendo mais utilizados os marcadores mitocondriais, pelo fato de apresentarem maior capacidade discriminatória, sendo capazes de distinguir espécies muito próximas, e ao mesmo tempo revelar certo grau de polimorfismo intraespecífico. Isso porque se sabe que o DNA mitocondrial apresenta uma taxa de evolução mais rápida do que o DNA nuclear, podendo fornecer informação útil o suficiente para reconstrução filogenética de espécies muito próximas de nematódeos (Blouin, 2002).

Uma iniciativa mundial denominada *International Barcoding of Life* (<http://www.barcodeoflife.org/>) tem por objetivo promover a identificação de espécies de maneira rápida e universal e desta maneira produzir em um banco de dados internacional de biodiversidade (BOLD). O conceito de *DNA Barcoding* proposto

inicialmente por Paul Hebert,(et al., 2003) se basea na aplicação padronizada de uma região curta do genoma para a identificação de espécies, denominada *barcode*. O gene *cox1* foi escolhido como *barcode* universal para animais (Miller et al.,2007). Entretanto, ainda não existem informações suficientes deste gene para anisacídeos, com um banco de dados até o momento de 3/9 espécies do gênero *Anisakis*, 3/11 de *Contracaecum* e 2/6 de *Pseudoterranova* (08/2012), o que dificulta as análises para identificação de espécie. Desta forma, alguns autores defendem a escolha do gene mitocondrial *cox2* como *barcode* na identificação de espécies de anisacídeos já que o banco de sequências para este marcador é bastante extenso e representativo (Mattiucci et al.,2009; Valentini et al.,2006; Mattiucci et al.,2011).

1.5) Taxonomia do gênero *Anisakis*

Segundo a revisão de Davey (1971), apenas três espécies eram validadas dentro do gênero *Anisakis*: *A. simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe, 1878), *A. typica* (Diesing, 1860) e *A. physeteris* (Baylis, 1923). Hoje, com o progresso da sistemática molecular já são reconhecidas 9 espécies, sendo que análises filogenéticas baseadas em bancos de aloenzimas e sequências do gene mtDNA *cox2* de todas as espécies geneticamente caracterizadas apontam para a existência de dois clados distintos e bem suportados (Mattiucci e Nascetti, 2006; Mattiucci et al., 2005; Valentini et al., 2006). No clado I estão incluídas as espécies-irmãs do complexo *A. simplex*- *A. simplex* (Rudolphi, 1809) sensu stricto (s.s.), *A. pegreffii* (Campana-Rouget e Biocca, 1955) e *A. simplex C* (Mattiucci et al., 1997), *A. typica* (Diesing, 1860), *A. ziphidarum* (Paggi et al. 1998) e *A. nascettii* (Mattiucci et al.,2009). O clado II inclui as espécies *A. paggiae* (Mattiucci et al.,2005), *A. brevispiculata* (Dollfus, 1968) e *A. physeteris* (Baylis, 1923) (Figura 1.3).

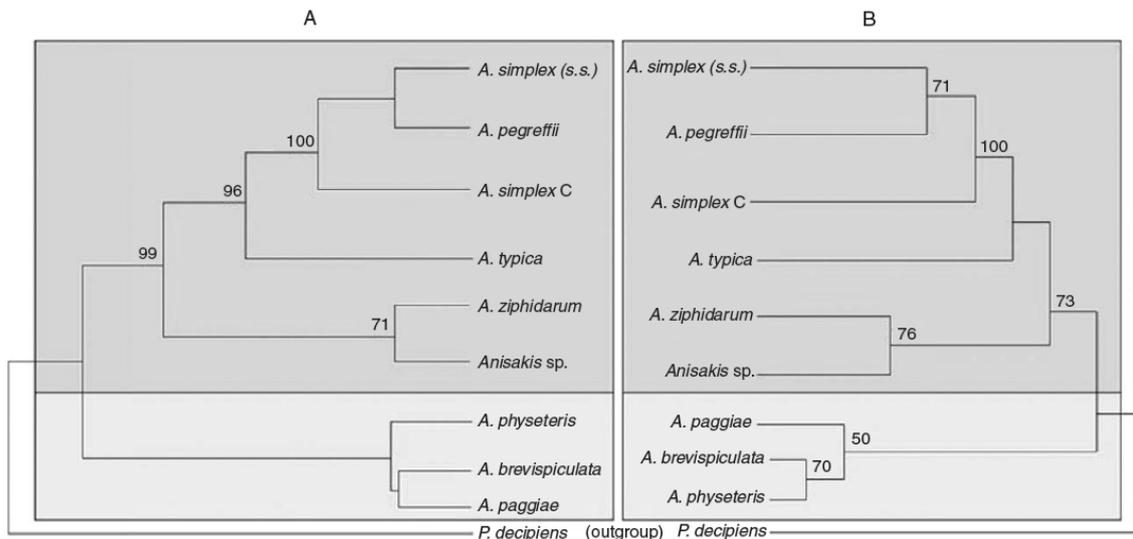


Figura 1.3. Relações genéticas entre *Anisakis* spp inferidas por **A)** análise de aloenzimas e **B)** sequencias do gene mtDNAcox2. Fonte: Mattiucci e Nascetti, 2008.

Essa heterogeneidade genética detectada dentro do gênero é também suportada tanto pelas diferenças morfológicas nos indivíduos adultos, como pelo morfotipo larval, como comentado anteriormente. Além disso, uma relação com a ecologia dos hospedeiros definitivos também pode ser inferida, sendo que espécies do clado I estão mais comumente associadas com golfinhos e baleias bicudas, enquanto que as do clado II com baleias de espermacete (Mattiucci e Nascetti, 2006, 2008). Devido a esta preferência por hospedeiros demonstrada pelos anisacuídeos, defende-se seu uso como indicadores biológicos para determinação de abundância e distribuição de seus hospedeiros definitivos (Kuhn et al.,2011).

1.6) Otimização da Extração e Amplificação do DNA a partir de amostras preservadas em soluções

Por séculos, após a coleta de espécimes biológicos, estes são geralmente preservados em soluções conservantes que evitam sua deterioração, e possibilitam posterior visualização ao microscópio (Fox et al.,1985). As soluções de preservação mais empregadas são a formalina, o álcool e o AFA (93% Álcool- 5% Formalina- 3% Ácido acético). Apesar de conservar a aparência externa da amostra, e no caso dos helmintos, muitas das características morfológicas, essas soluções de preservação acarretam alterações químicas que danificam a estrutura das moléculas de ácidos

nucléicos (Srinivasan et al.,2002). Desta forma, a obtenção de DNA íntegro e em altas concentrações nestas amostras torna-se uma tarefa difícil.

A literatura relata também técnicas aplicadas ao DNA antes de submetê-lo à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com intuito de maximizar sua eficiência. A técnica de polimerização reconstrutora (PR) atua na tentativa de reconstruir o DNA degradado, promovendo a geração de fragmentos amplificáveis. Para tanto, utiliza todos os reagentes de uma reação de PCR, com exceção dos primers, e baseia-se na polimerização por complementação dos fragmentos de sequencia, com geração de uma fita íntegra (Golenberg et al.,1996)(Figura 1.4)

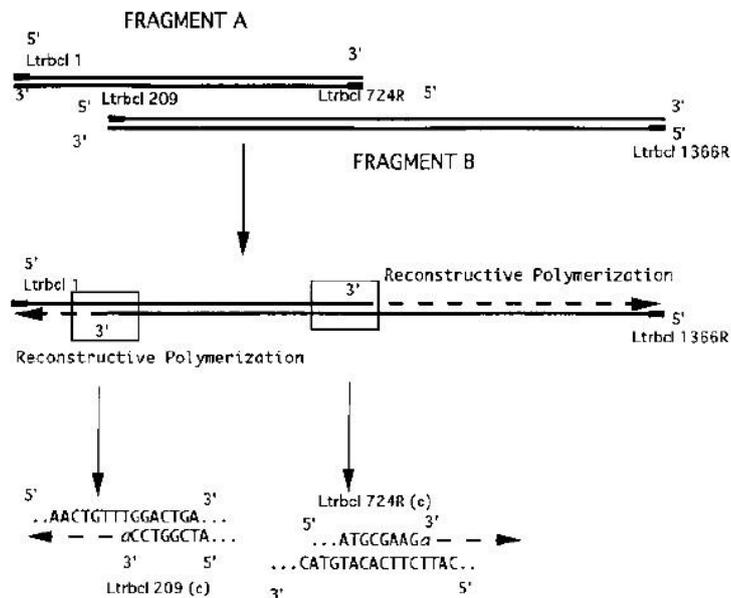


Figura 1.4. Polimerização Reconstrutora. Os fragmentos A e B degradados se sobrepõem para formar uma fita de DNA íntegra Fonte: Golemborg et al.,1996.

2. JUSTIFICATIVA

Este projeto de taxonomia integrada dos anisakuídeos da costa brasileira apresenta importância médica veterinária e econômica, além de grande valor taxonômico e contribuição para o enriquecimento do conhecimento da biodiversidade brasileira.

Com o aumento dos registros de casos de anisakuídose em todo mundo, torna-se imprescindível a identificação em nível de espécie dos anisakuídeos encontrados na costa brasileira, visto que algumas espécies são potencialmente capazes de desencadear a doença no homem, e ainda por vezes ocasionar quadros graves de reações alérgicas.

Lesões gástricas e outras patologias também vêm sendo recorrentemente registradas nos hospedeiros cetáceos, sendo importante a definição do espectro de parasitas nos hospedeiros para o monitoramento de morbidade/mortalidade nestes animais.

Além de estarem associados à mortalidade dos peixes, estes nematódeos provocam lesões teciduais que inviabilizam a comercialização do pescado, acarretando enormes prejuízos econômicos para indústria pesqueira. A identificação taxonômica/diagnóstico constitui o primeiro passo para a vigilância e controle do parasita.

A importância taxonômica vem da aplicação de diversos marcadores genéticos que sejam informativos o suficiente para determinar as espécies destes nematóides parasitas, ou seja, estabelecer os padrões de códigos de barras de DNA da espécie. A determinação destes padrões poderá discernir problemas taxonômicos apresentados tanto pela inconsistência de caracteres morfológicos, como pela ausência dos mesmos em determinados estágios do ciclo biológico. A identificação de anisakuídeos também irá contribuir para um melhor entendimento da distribuição e ecologia destes parasitos, visto que apenas duas espécies foram geneticamente identificadas até o momento no Brasil.

Os espécimes representativos das espécies identificadas neste estudo serão depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), conjuntamente com seu DNA e informação genética de sequências, que também serão disponibilizadas nos bancos internacionais de sequências (*GenBank* e *BOLD*), o que irá contribuir para o enriquecimento do banco de dados da biodiversidade de helmintos parasitos do Brasil e do mundo.

3. OBJETIVOS

3.1) OBJETIVO GERAL

Identificar, através da taxonomia integrada com base em análises morfológica e genética, as espécies de nematódeos da família Anisakidae parasitos de mamíferos marinhos provenientes do litoral do nordeste brasileiro.

3.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar morfológicamente as espécies da família Anisakidae de parasitos de cetáceos da costa do nordeste brasileiro com base na microscopia óptica.
2. Padronizar e aperfeiçoar um protocolo de extração de DNA para espécimes conservados em formalina ou álcool, que possa ser aplicado a materiais biológicos tombados em coleções científicas e outros acervos.
3. Determinar geneticamente as espécies da família Anisakidae parasitos de cetáceos da costa do nordeste brasileiro com base no gene *cox 2*.
4. Avaliar o gene *cox 2* como ferramenta de identificação taxonômica de código de barras de DNA de espécies de parasitos da família Anisakidae.
5. Determinar e avaliar o poder filogenético das regiões ITS, ITS-1, ITS-2, e o gene 18S rDNA.
6. Disponibilizar na coleção helmintológica do IOC/FIOCRUZ (CHIOC) os espécimes representativos das espécies de parasitos identificadas, conjuntamente com a informação genética física (alíquota de DNA extraído) e computacional (sequência primária de DNA) que também será depositada nos bancos de dados internacionais de informação genética.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1) Amostras

As amostras de anisaquídeos (n=195) são provenientes de cetáceos encalhados em praias de seis estados do nordeste do Brasil: Bahia, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará (Figura 4.1). Os helmintos foram coletados de 57 mamíferos marinhos da ordem Cetacea, de 13 espécies distintas, incluindo membros das famílias Delphinidae- *Globicephala macrorhynchus* Gray, 1846 (baleia-piloto-de-aleta-curta), *Lagenodelphis hosei* Fraser, 1956 (golfinho-de-fraser), *Peponocephala electra* Gray, 1846 (baleia-cabeça-de-melão), *Sotalia guianensis* van Bénédén, 1864 (boto-cinza), *Steno bredanensis* Lesson, 1828 (golfinho-de-dentes-rugosos), *Stenella clymene* Gray, 1850 (golfinho-climene), *Stenella coeruleoalba* Meyen, 1833 (golfinho riscado), *Stenella frontalis* Cuvier, 1829 (golfinho-pintado-do-Atlântico), *Stenella longirostris* Gray, 1828 (golfinho rotator) e *Tursiops truncatus* Montagu, 1821 (golfinho-nariz-de-garrafa); Kogiidae- *Kogia breviceps* de Blainville, 1838 (cachalote-pigmeu) e *Kogia simus* Owen, 1866 (cachalote-anão); e Ziphiidae- *Mesoplodon europaeus* Gervais, 1855 (baleia-bicuda-de-Gervais).

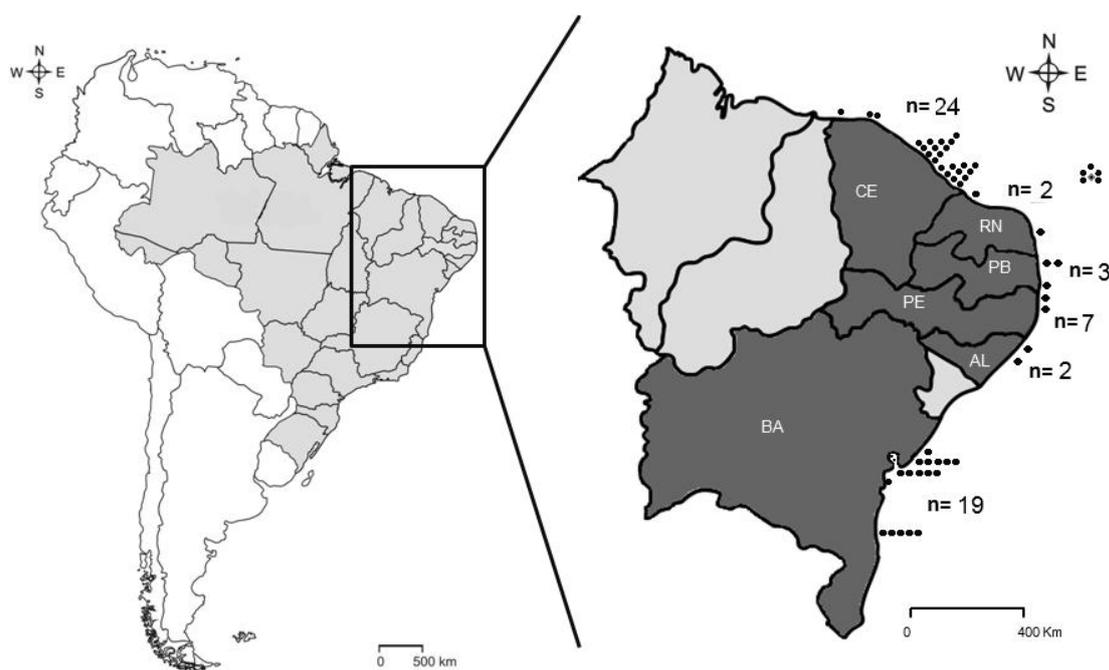


Figura 4.1. Localização geográfica do encalhe dos cetáceos deste estudo e número de indivíduos cetáceos por estado. Os pontos representam o local específico de encalhe no estado.

O número de espécimes de parasitos por hospedeiros separados para análise variou de 1 a 8 (Tabela 4.1). Os parasitos foram identificados como pertencentes à família Anisakidae (Carvalho et al.,2010) após visualização no microscópio óptico das estruturas internas e identificação morfológica baseada em chaves taxonômicas disponíveis na literatura (Davey, 1971).

Tabela 4.1. Relação de espécimes de parasito por hospedeiro e localização geográfica do encalhe dos cetáceos.

Amostra	n	Hospedeiros	Estado	Praia, Município
AV01	3	<i>Sotalia guianensis</i>	BA	Ondina, Salvador
AV02	3	<i>Sotalia guianensis</i>	BA	Arembepe, Camaçari
AV03	2	<i>Sotalia guianensis</i>	BA	Ilhéus
AV04	3	<i>Sotalia guianensis</i>	BA	Rio Vermelho, Salvador
AV05	1	<i>Sotalia guianensis</i>	BA	Camaçari
AV06	3	<i>Sotalia guianensis</i>	BA	Amaralina, Salvador
AV07	2	<i>Sotalia guianensis</i>	BA	Salvador
AV08	1	<i>Sotalia guianensis</i>	BA	Mar Grande, Vera Cruz
AV09	1	<i>Sotalia guianensis</i>	PE	Ilha de Itamaracá
AV10	4	<i>Sotalia guianensis</i>	PB	Lagoa da Praia, Rio Tinto
AV11	1	<i>Sotalia guianensis</i>	PE	Olinda
AV12	2	<i>Sotalia guianensis</i>	PB	Praia de Campina, Rio Tinto
AV13	3	<i>Sotalia guianensis</i>	RN	Natal
AV14	6	<i>Kogia breviceps</i>	CE	Águas Belas, Cascavel
AV15	4	<i>Kogia simus</i>	BA	Jauá, Camaçari
AV16	3	<i>Peponocephala electra</i>	CE	Barra do Ceará, Fortaleza
AV17	4	<i>Kogia breviceps</i>	CE	Majorlândia, Aracati
AV18	2	<i>Kogia simus</i>	BA	Lauro de Freitas
AV19	6	<i>Stenella clymene</i>	CE	Praia do Diogo, Beberibe
AV20	5	<i>Stenella longirostris</i>	CE	Prainha, Aquiraz
AV21	2	<i>Stenella clymene</i>	PB	Praia Bela, João Pessoa
AV22	3	<i>Stenella longirostris</i>	CE	Prainha, Aquiraz
AV23	3	<i>Stenella clymene</i>	BA	Ilhéus
AV24	4	<i>Stenella clymene</i>	AL	Praia de Peroba, Maragogi
AV25	3	<i>Steno bredanensis</i>	AL	Praia de Ipioca, Maceió
AV26	4	<i>Kogia breviceps</i>	BA	Guaibim, Valença
AV27	4	<i>Stenella longirostris</i>	RN	Praia de Barreiras, Macau
AV28	5	<i>Stenella clymene</i>	BA	Itapuã, Salvador

Continuação Tabela 4.1

Amostra	n	Hospedeiros	Estado	Praia, Município
AV29	2	<i>Stenella clymene</i>	BA	Ilhéus
AV30	4	<i>Stenella clymene</i>	CE	Paracurú
AV31	5	<i>Peponcephala electra</i>	CE	Barro Preto, Aquiraz
AV32	3	<i>Stenella longirostris</i>	CE	Icaraí, Caucaia
AV33	5	<i>Steno bredanensis</i>	CE	Iguape, Aquiraz
AV34	4	<i>Stenella coeruleoalba</i>	CE	Manibu, Icapuí
AV35	6	<i>Stenella longirostris</i>	CE	Barrinha, Icapuí
AV36	4	<i>Steno bredanensis</i>	BA	Ponta Grossa, Vera Cruz
AV37	4	<i>Stenella longirostris</i>	BA	Camaçari
AV38	5	<i>Tursiops truncatus</i>	BA	Ilhéus
AV39	5	<i>Kogia simus</i>	CE	Bitupitá, Barroquinha
AV40	4	<i>Stenella clymene</i>	CE	Almofala, Itarema
AV41	1	<i>Stenella frontalis</i>	CE	Lagoa do Mato, Aracati
AV42	7	<i>Stenella clymene</i>	BA	Itacimirim, Camaçari
AV43	8	<i>Kogia breviceps</i>	CE	Serviluz, Fortaleza
AV44	6	<i>Peponcephala electra</i>	CE	Icaraí, Caucaia
AV45	4	<i>Lagenodelphis hosei</i>	CE	Morro Branco, Beberibe
AV46	5	<i>Stenella longirostris</i>	CE	Barrinha, Icapuí
AV47	6	<i>Stenella coeruleoalba</i>	CE	Manibu, Icapuí
AV48	4	<i>Peponcephala electra</i>	CE	Barro Preto, Aquiraz
AV49	1	<i>Stenella clymene</i>	BA	Mata de São João Costa do Sauípe
AV50	4	<i>Globicephala macrorhynchus</i>	PE	Fernando de Noronha
AV51	1	<i>Stenella longirostris</i>	PE	Fernando de Noronha
AV52	5	<i>Stenella longirostris</i>	PE	Fernando de Noronha
AV53	1	<i>Stenella longirostris</i>	PE	Fernando de Noronha
AV54	1	<i>Stenella longirostris</i>	PE	Fernando de Noronha
AV55	1	<i>Stenella longirostris</i>	CE	Abreulândia, Fortaleza
AV56	1	<i>Mesoplodon europaeus</i>	CE	Praia do Preá, Cruz
AV57	1	<i>Stenella clymene</i>	CE	Canoa Quebrada, Aracati
TOTAL	195	57	6	26

A grande maioria dos parasitos (n= 192) estava conservada em AFA (Álcool 70% – 93 partes, Formalina 10% – cinco partes, Ácido acético – duas partes) ou Álcool 70%. Chegados ao laboratório, todos foram transferidos para uma solução de álcool 70%. O tempo de preservação variou de 6 – 19 anos (Tabela 4.2). Apenas três espécimes foram preservados por congelamento (- 20°C).

Tabela 4.2. Período de preservação (em anos) e conservante das amostras deste estudo.

Amostra	Conservante	T pres	Amostra	Conservante	T pres
AV 1	Álcool 70%	16	AV 30	AFA	12
AV 2	Álcool 70%	12	AV 31	Álcool 70%	19
AV 3	AFA	7	AV 32	AFA	12
AV 4	AFA	11	AV 33	AFA	19
AV 5	AFA	11	AV 34	AFA	8
AV 6	Álcool 70%	13	AV 35	AFA	12
AV 7	Álcool 70%	11	AV 36	Álcool 70%	7
AV 8	Álcool 70%	9	AV 37	AFA	11
AV 9	Álcool 70%	12	AV 38	Álcool 70%	8
AV 10	AFA	14	AV 39	AFA	6
AV 11	AFA	10	AV 40	AFA	9
AV 12	Álcool 70%	12	AV 41	AFA	9
AV 13	Álcool 70%	7	AV 42	AFA	13
AV 14	AFA	9	AV 43	AFA	16
AV 15	Álcool 70%	12	AV 44	Álcool 70%	16
AV 16	AFA	10	AV 45	AFA	6
AV 17	AFA	8	AV 46	Álcool 70%	12
AV 18	Álcool 70%	11	AV 47	AFA	8
AV 19	AFA	13	AV 48	AFA	19
AV 20	AFA	7	AV 49	Álcool 70%	9
AV 21	Álcool 70%	13	AV 50	Álcool 70%	14
AV 22	AFA	7	AV 51	AFA	14
AV 23	Álcool 70%	7	AV 52	Álcool 70%	14
AV 24	Álcool 70%	13	AV 53	Álcool 70%	14
AV 25	Álcool 70%	8	AV 54	Álcool 70%	14
AV 26	AFA	11	AV 55	Congelado	0
AV 27	AFA	12	AV 56	Congelado	0
AV 28	Álcool 70%	14	AV 57	Congelado	0
AV 29	Álcool 70%	7			

4.2) Análise Morfológica

Para a análise morfológica, as porções anteriores e posteriores dos espécimes foram separadas, por conter os caracteres morfológicos de importância taxonômica, e a parte central do espécime foi reservada para a análise genética. Para a visualização das estruturas internas, os espécimes foram clarificados em lactofenol de Amman e então visualizados e analisados em microscópio óptico (Olympus BX40) segundo chaves taxonômicas presentes em Davey (1971) e Mattiucci et al.

(2005). Os caracteres morfológicos observados e os dados morfométricos avaliados foram: comprimento e largura do corpo, do esôfago e do ventrículo, e, nos machos, o formato e comprimento dos espículos e das placas denticuladas (“*plactanes*”) Registros fotográficos foram feitos e desenhos confeccionados com auxílio de uma câmera lúcida acoplada ao microscópio (Olympus BX40).

4.3) Análise Genética

4.3.1) Extração de DNA

As amostras foram lavadas com solução salina ou PBS a 4°C durante 24-48h para eliminação dos conservantes e então submetidas à digestão e posterior extração.

Devido à natureza do material, fixado em formalina, etanol, ou AFA, diferentes métodos e kits de extração de DNA foram empregados, com o propósito de se obter uma maior eficiência quanto à concentração e qualidade do DNA extraído. A comparação da eficiência dos métodos foi realizada, onde sete amostras, com diferentes tempos de preservação e com espécimes de grande comprimento foram selecionadas. Cada helminto foi dividido em cinco partes e cada porção foi submetida a um método de extração. O volume final de eluição para todas as metodologias aplicadas foi de 40µL com tampão TAE. O método com melhor desempenho foi então aplicado às demais amostras. O teste de Friedman (Friedman, 1940) foi realizado para avaliar se as técnicas diferiam significativamente na eficiência de extração de DNA. Comparações múltiplas foram feitas para detectar entre que técnicas ocorreram diferenças significativas mediante o teste de Wilcoxon (Wilcoxon, 1945) e definir aquele com melhor desempenho.

As concentrações de DNA foram estimadas pela absorvância relativa a 260nm em aparelho Nanovue plus™ (GE Healthcare®).

4.3.1.1) Pré-Tratamento da Extração do DNA – Digestão com CTAB.

As amostras foram submetidas ao processo de digestão com uma solução de CTAB (2% CTAB, 100 mM TrisHCl, 20 mM EDTA, 1.4M NaCl) pré-aquecido à 60°C por 30 minutos, sendo acrescentado no momento 0.2% β -mercaptoethanol, e SDS 1% (Adaptado de Doyle e Doyle, 1987). Posteriormente mais 200 μ L de tampão de CTAB pré-aquecido (56°C por 30 minutos) foram acrescentados, e a amostra foi imersa em nitrogênio líquido e então macerada. Em seguida, acrescentaram-se 200 μ L de tampão de digestão (NaCl 10 mM, Tris–HCl 10 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0) e 20 μ L de proteinase K (20mg/ml) e seguiu-se com a digestão *overnight* a 56°C (Iñiguez et al., 2006). Após o pré-tratamento, aplicou-se o método que apresentou melhor desempenho dentre os descritos abaixo.

4.3.1.2) QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen)

Este kit comercial foi aplicado segundo as instruções fornecidas pelo fabricante para o protocolo-Purificação de DNA a partir de tecidos-com algumas modificações: 100 μ L de tampão ATL foram acrescentados às amostras para maceração e mais 100 μ L de tampão ATL e 20 μ L de proteinase K (20mg/ml) foram adicionados para a digestão. Após agitação por 15”, seguiu-se com a digestão *overnight* a 56°C.. As etapas seguintes foram seguidas como descrito no protocolo do fabricante.

4.3.1.3) DNA IQ™ System (Promega)

Este kit comercial foi aplicado segundo o protocolo descrito pelo fabricante, exceto por uma etapa de digestão onde 400 μ L de tampão de digestão (NaCl 100mM, Tris-HCl 50mM, SDS 1% e EDTA 50mM) e 20 μ L de proteinase K (20mg/ml) foram adicionadas às amostras previamente maceradas em nitrogênio líquido e incubadas a 56°C por 24 horas (Iñiguez et al., 2006). 100 μ L do produto de digestão foram utilizados nas etapas seguintes do protocolo conforme descritas pelo fabricante.

4.3.1.4) Método de Fenol:Clorofórmio

O método foi aplicado segundo instruções de Sambrook e Russel (2001). O DNA extraído foi purificado em coluna de sílica com a aplicação do kit comercial illustra™ GFX™ PCR DNA Purification (GE Healthcare®).

4.3.1.5) QIAamp® DNA Investigator (Qiagen)

Na aplicação deste kit utilizamos uma solução de proteinase K (20mg/ml) substituindo a fornecida pelo kit. Adicionalmente, aumentamos o tempo de incubação com tampão de eluição TAE para 10 minutos à temperatura ambiente, e a centrifugação final para 14.000 rpm. As demais etapas foram seguidas conforme as instruções do fabricante.

4.3.2) Tratamentos pré-amplificação do DNA - Polimerização Reconstutora

Um experimento para avaliar a eficiência da técnica foi realizado, onde se comparou o desempenho da PCR quando as amostras eram submetidas ou não a esta etapa pré-amplificação.

As reações foram feitas segundo Golembeg et al.,1996, em volume final de 25µL, utilizando 10mM-Tris-HCl (pH 8.0), 50mM-KCl, 2.5 mM-MgCl₂, 0.2mM de cada dNTP,1.5U Taq polymerase (Platinum Invitrogen) e 5µL de DNA. O mix foi então submetido a um ciclo inicial a 96°C, seguido de 20 ciclos de 96 °C por 8", 56 °C por 8" e 72 °C por 8". Cinco microlitros do produto desta reação foram utilizados para a PCR.

4.3.3) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sequenciamento Nucleotídico

O principal alvo genético utilizado para a identificação molecular foi o gene *cox2*, que é considerado o *barcode* para espécies de *Anisakis* sp. Adicionalmente, também foram aplicados os alvos dos genes *cox1*, ITS completo, ITS1, ITS2. Primers específicos para a região ITS das espécies *A. paggiae* e *A. typica* foram desenhados com uso do programa Primer 3 (Rozen e Skaletsky, 2000). A Tabela 3 resume todos

os marcadores genéticos e primers utilizados neste trabalho com suas respectivas referências.

As reações foram realizadas em um volume final de 50µL ou 25µL, contendo 10mM-Tris-HCl (pH 8.0), 50mM-KCl, 2.5 mM-MgCl₂, 0.2mM de cada dNTP, 250 ng de cada primer, 1.5U Taq polymerase (Platinum Invitrogen) e 10–50 ng do DNA genômico. Os produtos de reação foram submetidos a ciclos de temperatura em termociclador Eppendorf® sob as seguintes condições: ciclo inicial de 3 minutos, a 94°C, seguido de 40 ciclos de 94°C por 40s, 45°C (*cox1* e *cox2*) ou 57 °C (regiões ITS) por 40s e 72°C por 40s.

Tabela 4.3. Alvos genéticos e primers utilizados neste estudo.

Alvo	Tamanho	Primers	Referência
cox 1	1040 pb	AsinCO1 F (5'-ATTTGGTCTTTGGTCTGGTATGG-3') AsinCO1 R (5'-CATGTAAAATAACATCCAAACTAG-3')	Desenhados neste estudo
	760	AsinCO1 F (5'-ATTTGGTCTTTGGTCTGGTATGG-3') AsinCO1 R2 (5'-GCATAGACCATCCCCAAGAACC-3')	
	185	AsinCO1 F (5'-ATTTGGTCTTTGGTCTGGTATGG-3') AsinCO1 R3 (5'-AGGAGCACCCAAACATAAGAGGCA-3')	
cox 2	629 pb	210 F (5'-CACCAACTCTTAAAATTATC-3') 211 R (5'TTTTCTAGTTATATAGATTGRTTYAT-3')	Nadler e Hudspeth, 2000
cox2 <i>A. paggiae</i>	316 pb	Apa F1 (5'-TAGGTTGCTTTTTGGGGTGT-3') Apa R1 (5'-CCCCAGCTCCAAGTATCTA -3')	Desenhados neste estudo
cox2 <i>A. paggiae</i>	173 pb	Apag F2 (5'-GAGTTCAGTGACATCCCTGGT-3') Apag R2 (5'-GGCAAAGCCCAAGAATGAAT-3')	Desenhados neste estudo
ITS	1kb	NC5 F(5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT- 3') NC2 R (5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3')	Zhu et al.,1998
ITS-1	~500 pb	NC5 F(5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT- 3') NC13 R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGAT -3')	Zhu et al.,1998
ITS-2	~500 pb	NC13 F (5'-ATCGATGAAGAACGCAGC-3') NC2 R (5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3')	Zhu et al.,1998
ITS <i>A. paggiae</i>	141 pb	ITSAp F (5'- CGGCTGTGAAGCATTCCGGCG-3') ITSAp R (5'-TGCGACCACCAATATCACCGCA-3)	Desenhados neste estudo
ITS <i>A. typica</i>	513 pb	ANISAKISITS F (5'-ACCAATTTGGCTGTCTACGC-3') ATYPICAITS R (5'-TTTAGCAGACGTTGGGTGTG-3')	Iñiguez et al.,2009
18S rDNA	400 pb	SSU-A F (5'-AAAGATTAAGCCATGCATG-3') SSU-22 R (5'-GCCTGCTGCCTTCCTTGGA-3')	Dorris e Blaxter, 2000

Para a eletroforese, 10µL de produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1 – 2%, e visualizados em transluminador de luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio (0.5µg/mL). Os produtos foram então purificados com o Kit illustra™ GFX™ PCR DNA Purification (GE Healthcare®) e eluídos em 20-50 µL de Tris-EDTA (TE). Os amplicons foram sequenciados em ambas as direções usando o kit *Big Dye terminator v 3.1* (Applied Biosystems) segundo instruções dos fabricantes em sequenciador de DNA automático (Applied Biosystems ABI 3730 XL) da plataforma genômica de sequenciamento- PDTIS/FIOCRUZ.

4.3.4) Análises de sequências, filogenética e de distancias genéticas.

As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa DNA Star (Lasergene). A análise das sequências foi feita pelo uso de comando Pairwise/Blast/NCBI, Clustal W v.1.4 (Thompson et al., 1994) e os programas BioEdit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999) e MEGA v. 5 (Tamura et al., 2011). As distâncias genéticas interespecíficas e intraespecíficas entre as sequências foram calculadas usando o banco de dados disponível no GenBank (08/2012). O modelo aplicado foi o Kimura-2-Parâmetros (K2P) (Kimura, 1980) no software MEGA v. 5. Gráficos plotando as distâncias intra e interespecífica das espécies identificadas geneticamente no estudo foram construídos com auxílio do programa Microsoft Office Excel 2007, com o objetivo de visualizar a existência ou não de um *barcoding gap* e assim avaliar a eficiência do marcador como barcode.

A árvore filogenética foi construída no MEGA v. 5 utilizando-se o banco de dados descrito acima e o método de Neighbour-Joining (NJ), modelo K2P com 1000 repetições de *bootstrap* e o parâmetro de deleção completa. A tradução para aminoácidos foi feita com uso da tabela de codon 5, mitocondrial invertebrado no GenDoc (Nicholas & Nicholas 1997). A análise de sequência proteica foi feita no BioEdit v. 7.0.5.3 e no MEGA v.5.

5. RESULTADOS

5.1) Análise Morfológica

Todos os espécimes deste estudo (n=195) foram analisados sob microscópio óptico, mas em somente 88 (45,1%) foi possível a observação dos caracteres morfológicos de importância taxonômica. No restante dos espécimes não foi possível a análise destas estruturas, cuja visualização se tornou difícil devido a: 1) mau estado de conservação dos helmintos; 2) endurecimento dos parasitas, principalmente aqueles conservados por longos períodos (> 10 anos), o que impossibilitou a observação em lâmina de microscópio.

As análises morfológica e morfométrica identificaram 84 nematódeos (95,5%) como sendo *Anisakis* sp. e 4 (4,5%) como *Pseudoterranova* sp. As medidas obtidas pela análise morfométrica estão mostradas na Tabela 5.1. Dos espécimes *Anisakis* sp., 60 (71,4%) foram identificados como pertencentes ao clado I (Figura 5.1) e 24 (28,6%) ao clado II (Figura 5.2). Além de adultos, foram também identificadas larvas do tipo I (Figura 5.3), apresentando ventrículo longo e presença de mucron na cauda, e do tipo II (Figura 5.4), com ventrículo curto e ausência de mucron (Berland, 1961). É possível observar que os espécimes adultos pertencentes ao clado I apresentam ventrículo longo (> 0.7 mm) e espículos longos (>0.7 mm), enquanto que aqueles incluídos no clado II apresentam ambas as estruturas curtas, menor que 0.6 mm e 0.21 mm, respectivamente. Ainda, foram identificados espécimes apresentando ceco intestinal e ausência de apêndice ventricular, os quais foram identificados como *Pseudoterranova* sp. (Tabela 5.1, Figura 5.5).

Dos espécimes incluídos no clado II, em cinco foi possível concluir a identificação em nível de espécie, *A. paggiae*, a partir das seguintes observações: ventrículo curto (<0.4 mm), em forma de violino; espículos curtos (<0.21), robustos, sendo o par de tamanho similar; presença de três placas caudais denticuladas (*plactanes*), sendo a primeira mais longa (0.049-0.052), a segunda menor (0.03-0.04) e a terceira semi-circular (0.04-0.045) (Tabela 5.1, Figura 5.6).

5.1.1) Descrição morfológica dos espécimes

***Anisakis* sp.**

Presença de três lábios, cada um apresentando uma projeção bilobular com ápice dentífero; ausência de interlábios; esôfago muscular, ligado ao ventrículo por uma junção oblíqua, sigmoide ou retilínea; ausência de apêndice ventricular e ceco intestinal; presença de numerosas papilas pré-cloacais; grupo de três a quatro pares de papilas pós-cloacais.

***Anisakis* sp. Clado I**

Espécimes adultos com ventrículo longo (> 0.7 mm) e/ou espículos também longos (> 0.7 mm) e larvas com morfotipo larval do tipo I (*sensu* Berland) foram incluídos no clado I de *Anisakis* sp. conforme descrito na referência (Mattiucci and Nascettii, 2008).

Medidas em mm, média e desvio-padrão entre parênteses

Machos (n=9)

Comprimento do corpo 25-54 (45±10.8). Esôfago 2.1-2.8 (2.4±0.2). Ventrículo 0.7-1.4 (0.9±0.3) em comprimento e 0.16-0.28 (0.2±0.04) em largura. Razão entre esôfago e ventrículo 1:3 – 1:2 (1:2.7). Espículos longos, finos, de tamanhos distintos. Espículo direito 0.7-1.6 (1±0.3). Espículo esquerdo 2.1-3.1 (2.4±0.4). Razão entre os espículos 1:3-1:9 (1:5). *Plactanes* não observadas.

Fêmeas (n=43)

Comprimento do corpo 28-72 (64±11.8). Esôfago 2.1-3.3 (2.8±0.3). Ventrículo 0.82-1.7 (1.3±0.3) em comprimento e 0.2-0.34 (0.25±0.04) em largura. Razão entre esôfago e ventrículo 1:2 – 1:2.5 (1:2.15). Vulva localizada no meio do corpo.

Larvas tipo I *sensu* Berland

Presença de mucron na cauda, ventrículo longo (> 0.5mm). Comprimento do corpo 12-23 (17±4). Esôfago 1.3-1.9 (1.6±0.2). Ventrículo 0.5-1.1 (0.7±0.2) em comprimento e 0.13-0.25 (0.19±0.4) em largura. Razão entre esôfago e ventrículo 1:2 – 1:2.5 (1:2.15).

***Anisakis* sp. Clado II**

Espécimes adultos com ventrículo curto (< 0.6 mm) e/ou espículos também curtos (< 0.21 mm) e larvas com morfotipo larval do tipo II (*sensu* Berland) foram incluídos no clado II de *Anisakis* sp., segundo critérios descritos na referência (Mattiucci and Nascettii, 2008).

Anisakis paggiae

Corpo robusto. Estrias transversais cuticulares presentes em todo corpo. Lábios dorsal e ventro-lateral com uma projeção anterior com cristas dentíferas na sua superfície interna. Lábio dorsal com duas papilas duplas e cada papila ventro-lateral com uma papila dupla. Esôfago muscular, alargado na porção final. Ventrículo curto, robusto, em forma de violino, conectado ao intestino por uma junção oblíqua.

Machos (n=5)

Comprimento do corpo 22-38 (32.5±5.5). Esôfago 1.8-2.5 (2.15±0.3). Ventrículo 0.34-0.4 (0.37±0.3) em comprimento, 0.2-0.28 (0.26±0.3) em largura. Razão entre esôfago e ventrículo 1:5.3 – 1:6.25 (1:5.8). Espículos curtos, robustos, de tamanho similar. Espículo direito 0.17-0.20 (0.18±0.01), espículo esquerdo 0.18-0.21 (0.19±0.01). Razão entre os espículos 1: 1.06. Cauda arredondada, extremidade distal curvada. Três pequenas lâminas caudais denticuladas (*plectanes*) presentes, a primeira, próxima à cloaca é maior, 0.049-0.052 (0.05±0.001); a segunda é curva, 0.03-0.04 (0.037±0.001) e a terceira é semicircular, 0.04-0.045 (0.041±0.001). Papilas caudais pós-cloacais: um par de papilas paracloacais e 4 pares de papilas distais.

Fêmeas (n= 13)

Comprimento do corpo 24-42 (35 ± 6.1). Comprimento do esôfago 2- 3.3 (2.6 ± 0.4). Ventrículo 0.36-0.6 (0.44 ± 0.09) em comprimento e 0.3-0.36 (0.32 ± 0.02) em largura. Razão entre esôfago e ventrículo 1:5 -1:9 (1:8) Espículos e *plactanes* ausentes. Vulva pequena, situada no primeiro terço do corpo.

Larvas tipo II *sensu* Berland

Cauda pontiaguda, mucron ausente. Ventrículo curto (< 0.4 mm). Alguns espécimes apresentavam dente larvar. Comprimento do corpo 16-23 (19.5 ± 2.2). Esôfago 1.3-1.9 (1.7 ± 0.2). Ventrículo 0.23-0.4 (0.32 ± 0.07) em comprimento e 0.15-0.22 (0.18 ± 0.02) em largura. Razão entre esôfago e ventrículo 1:5 – 1:5.6 (1:5.3).

***Pseudoterranova* sp.**

Cutícula com estriações transversais finas. Lábios de tamanho similar, alargados na base. Lábio dorsal com porção basal mais larga do que dos lábios ventro-laterais. Duas papilas duplas laterais presentes no lábio dorsal e papilas simples em cada lábio ventro-lateral. Interlabio ausente. Ceco intestinal presente, apêndice ventricular ausente.

Machos (n=2)

Comprimento do corpo 20 e 25. Esôfago 1.9 e 2.3. Ventrículo 0.43 e 0.51 em comprimento e 0.13 e 0.16 em largura. Ceco intestinal 0.56 e 0.62. Cauda longa, cônica e curvada ventralmente. Espículos de tamanho similar; espículo direito 0.23 e 0.27; espículo esquerdo 0.24 e 0.29. Numerosas papilas caudais presentes. *Plactanes* não observadas.

Fêmeas (n=2)

Comprimento do corpo 28 e 31. Esôfago 2.5 e 2.8. Ventrículo 0.48 e 0.56 em comprimento e 0.18 e 0.23 em largura. Ceco intestinal 0.64 e 0.71. Espículos ausentes. Vulva não observada.

Tabela 5.1: Dados morfométricos dos espécimes sob avaliação morfológica neste estudo. O intervalo mostrado corresponde à menor e à maior medida e parênteses estão mostrados a média e o desvio-padrão, respectivamente. Dados em mm. N.O.: Não-Observado.

	<i>Anisakis</i> sp. (n=84)						<i>Pseudoterranova</i> sp. (n=4)	
	<i>Anisakis</i> sp. clado I (n=60)			<i>Anisakis</i> sp. clado II (n=24)				
	Machos (n=9)	Fêmeas (n=43)	L3/L4 (n=8)	Machos (n=5)	Fêmeas (n=13)	L3/L4 (n=6)	Machos (n=2)	Fêmeas (n=2)
Comp Corpo	25-54 (45±10.8)	28-72 (64±11.8)	12-23 (17±4)	22-38 (32.5±5)	24-42 (35±6.1)	16-23 (19,5±2.2)	20 e 25	28 e 31
Largura Corpo	0.48-1.2 (0.52±0.2)	0.64-1.6 (0.96±0.3)	0.3 – 0.85 (0.51±0.2)	0.51-0.68 (0.56±0.2)	0.62 – 0.85 (0.69±0.1)	0.4-0.65 (0.54±0.1)	0.58 e 0.62	0.59 e 0.63
Comp Esôfago	2.1-2.8 (2.4±0.2)	2.1–3.3 (2.8±0.3)	1.3-1.9 (1.6±0.2)	1.8-2.5 (2.15±0.3)	2-3.3 (2.6±0.4)	1.3-1.98 (1.7±0.2)	1.9 e 2.3	2.5 e 2.8
Comp ventrículo	0.7-1.4 (0.9±0.3)	0.82-1.7 (1.3±0.3)	0.5-1.1 (0.7±0.2)	0.34-0.4 (0.37±0.03)	0.36-0.6 (0.44±0.09)	0.23-0.4 (0.32±0.07)	0.43 e 0.51	0.48 e 0.56
Largura ventrículo	0.16-0.28 (0.2±0.04)	0.2-0.34 (0.25±0.04)	0.13-0.25 (0.19±0.4)	0.2-0.28 (0.26±0.03)	0.3-0.36 (0.32±0.02)	0.15-0.22 (0.18±0.02)	0.13 e 0.16	0.18 e 0.23
Ceco intestinal	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	0.56 e 0.62	0.64 e 0.71
Espículos	0.7-1.6 (1±0.3) 2.1-3.1 (2.4±0.4)	Ausente	Ausente	0.17-0.20 (0.18±0.01) 0.18-0,21 (0.19±0.01) 33	Ausente	Ausente	0.23 e 0.24 0.27 e 0.29	Ausente
Plactanes	N.O.	Ausente	Ausente	0.049-0.052 (0.05±0.001) 0.03-0.04 (0.037±0.001) 0.04-0.045 (0.041±0.001)	Ausente	Ausente	N.O.	Ausente

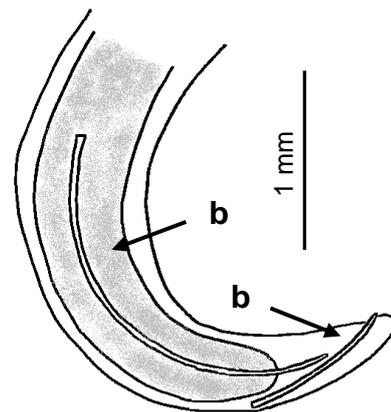
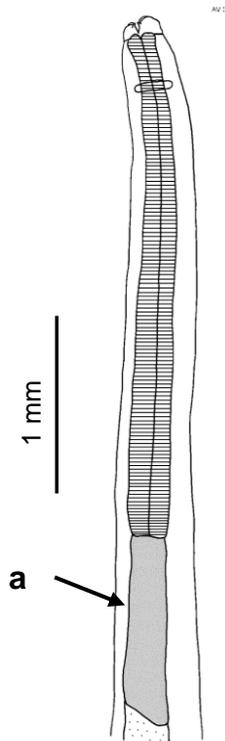
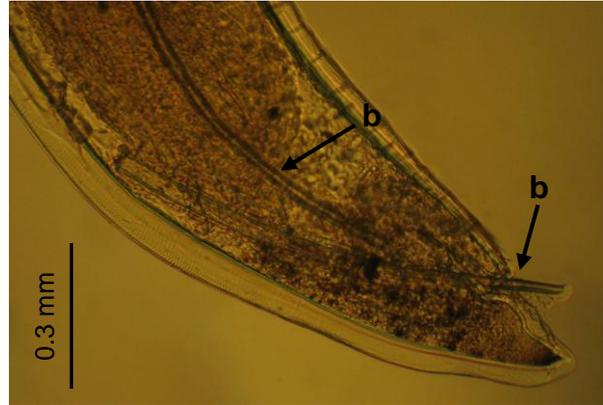
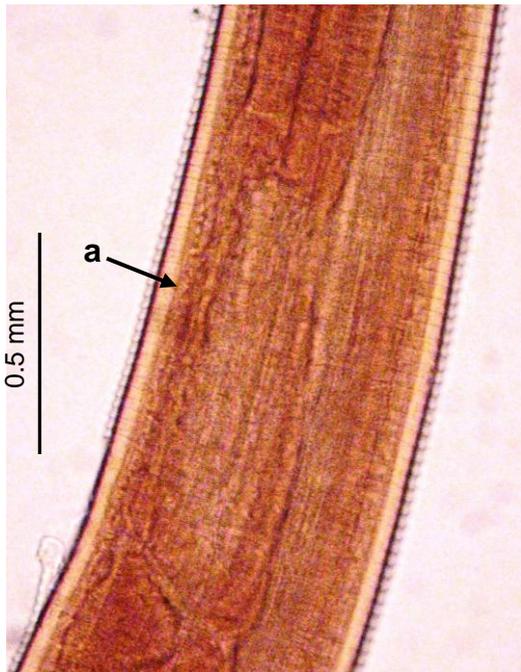


Figura 5.1: Registros fotográficos e desenhos de espécimes identificados como pertencentes ao clado I. **a-** ventrículo; **b-** espículo. Espécime 34.4.

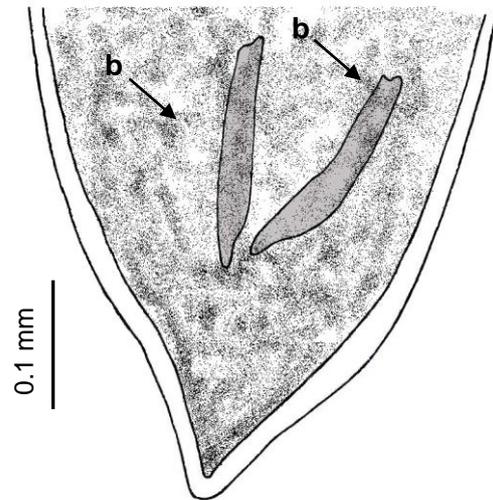
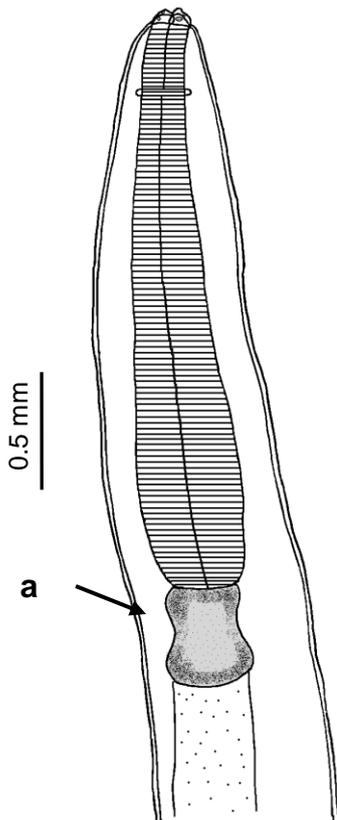
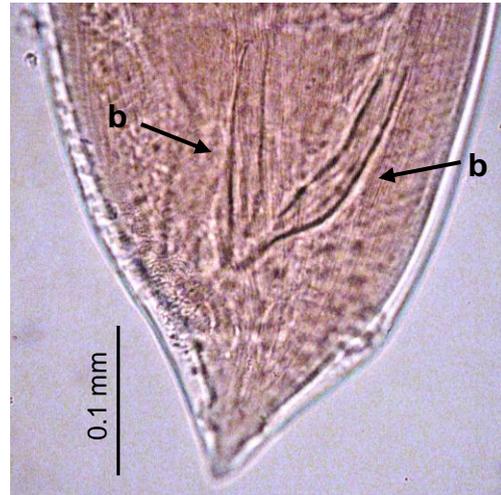
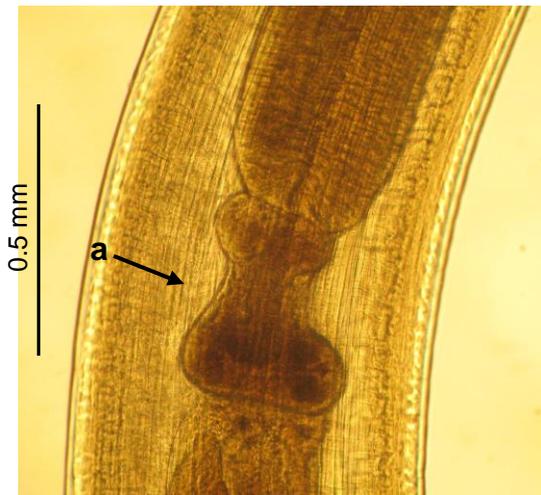


Figura 5.2: Registros fotográficos e desenhos de espécimes identificados como pertencentes ao clado II. **a-** Ventrículo; **b-** Espiculo. Espécime 17.2.

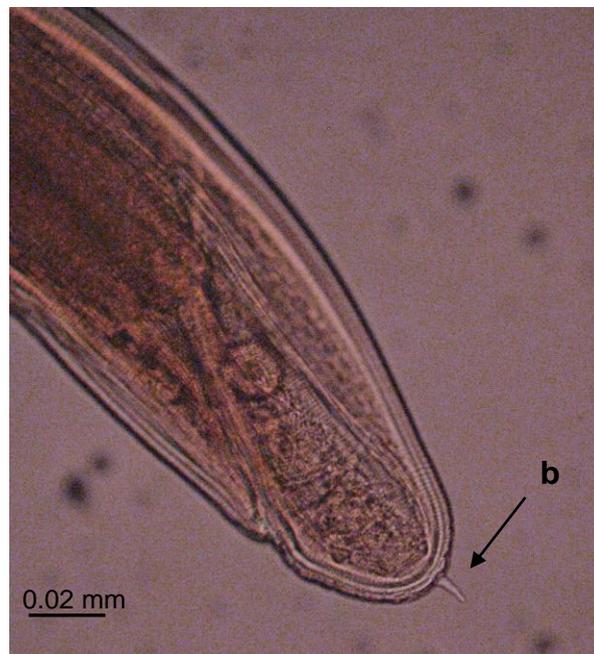
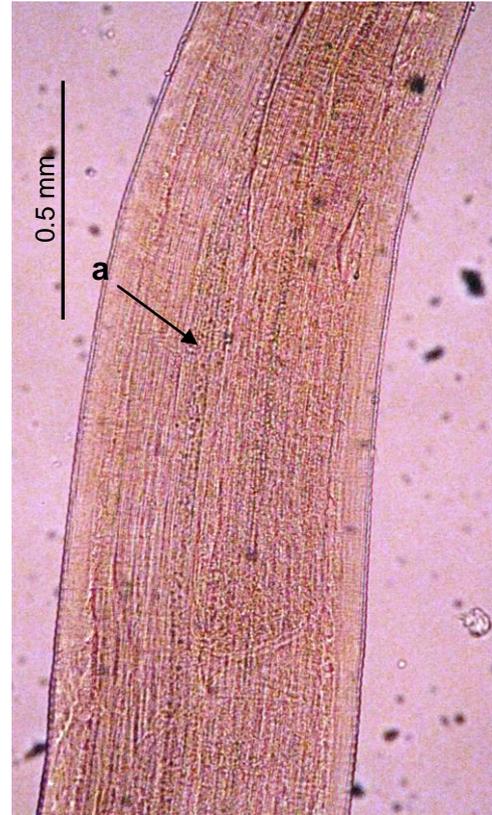
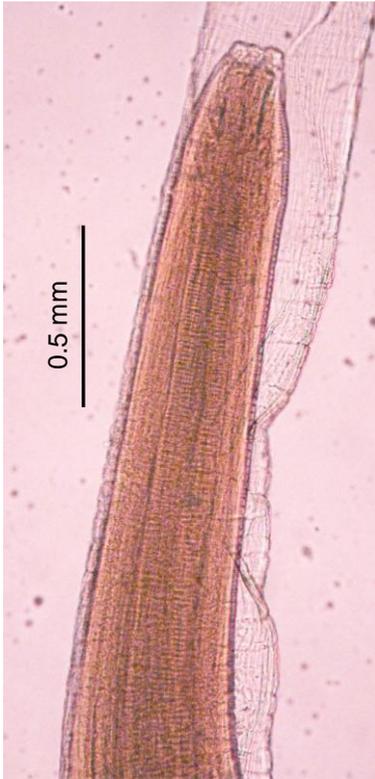


Figura 5.3: Registros fotográficos de larvas do tipo I (*sensu* Berland). **a-** Ventrículo; **b-** Mucron. Espécime 42.1.

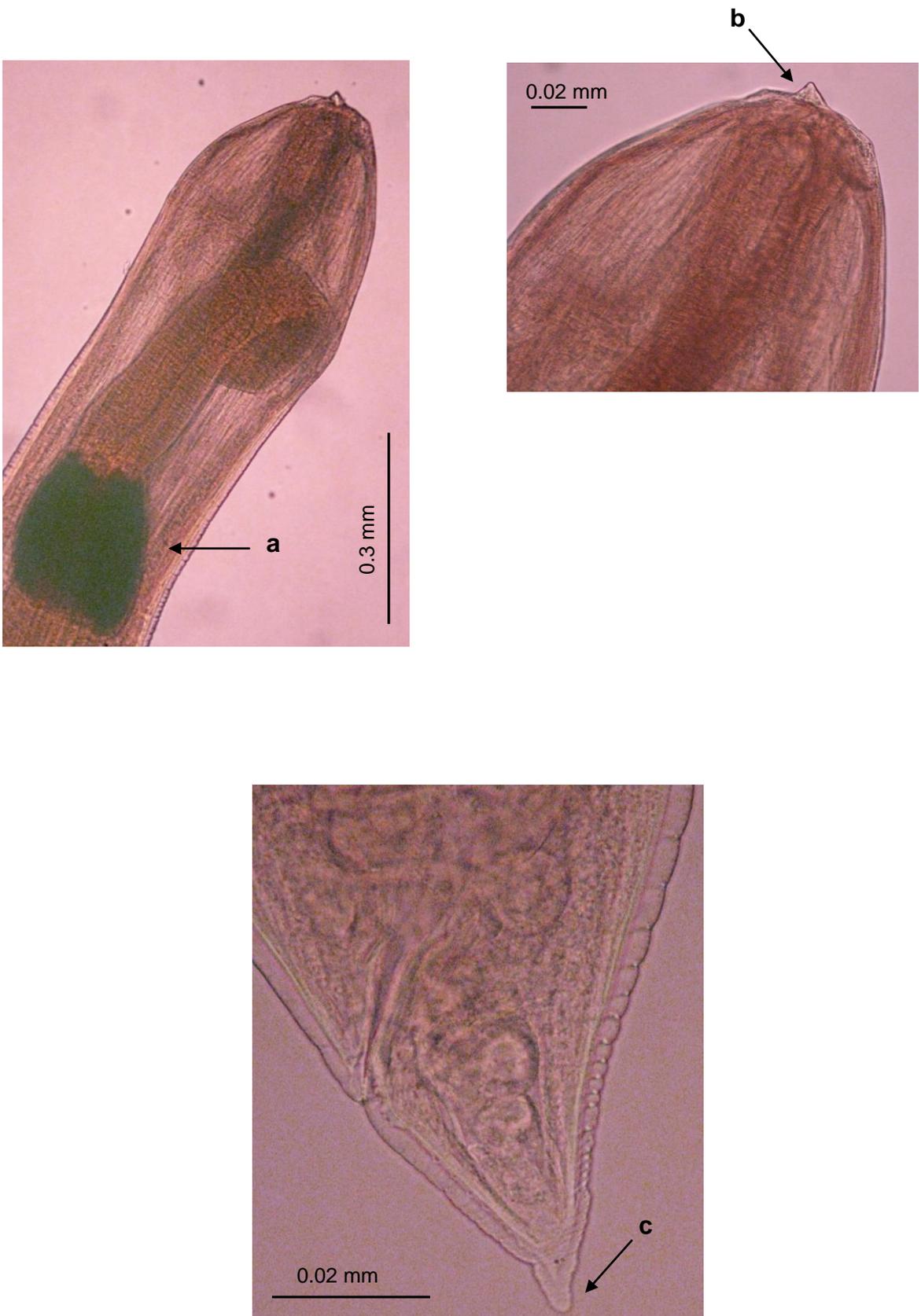


Figura 5.4: Registros fotográficos de larvas do tipo II (*sensu* Berland). **a-** Ventrículo; **b-** Dente larvar; **c-** cauda pontiaguda sem mucron. Espécime 18.2.

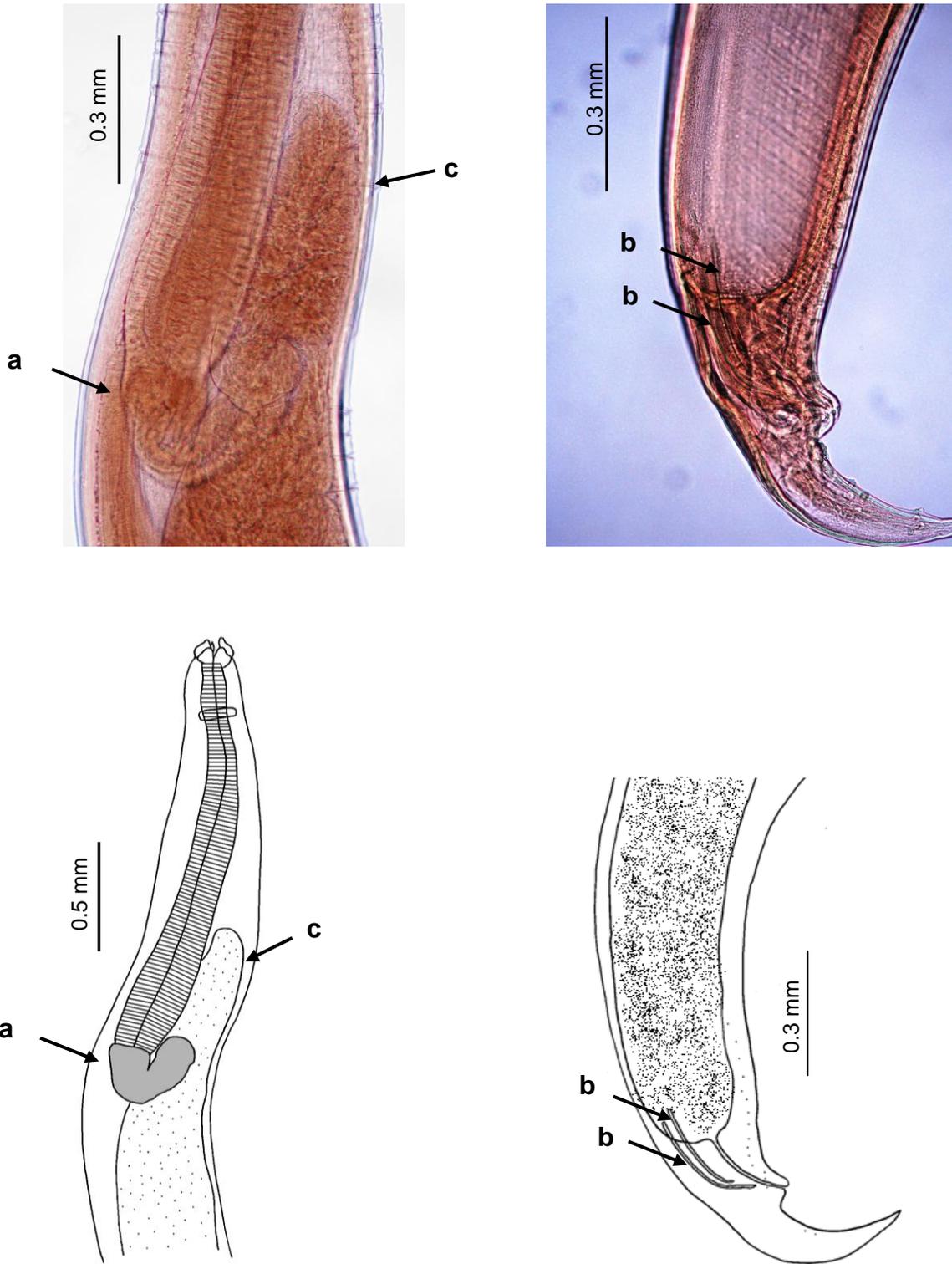


Figura 5.5: Registros fotográficos e desenhos de espécimes identificados como pertencentes ao gênero *Pseudoterranova*. **a-** Ventrículo; **b-** Espículo; **c-** Ceco intestinal. Espécime 37.2.

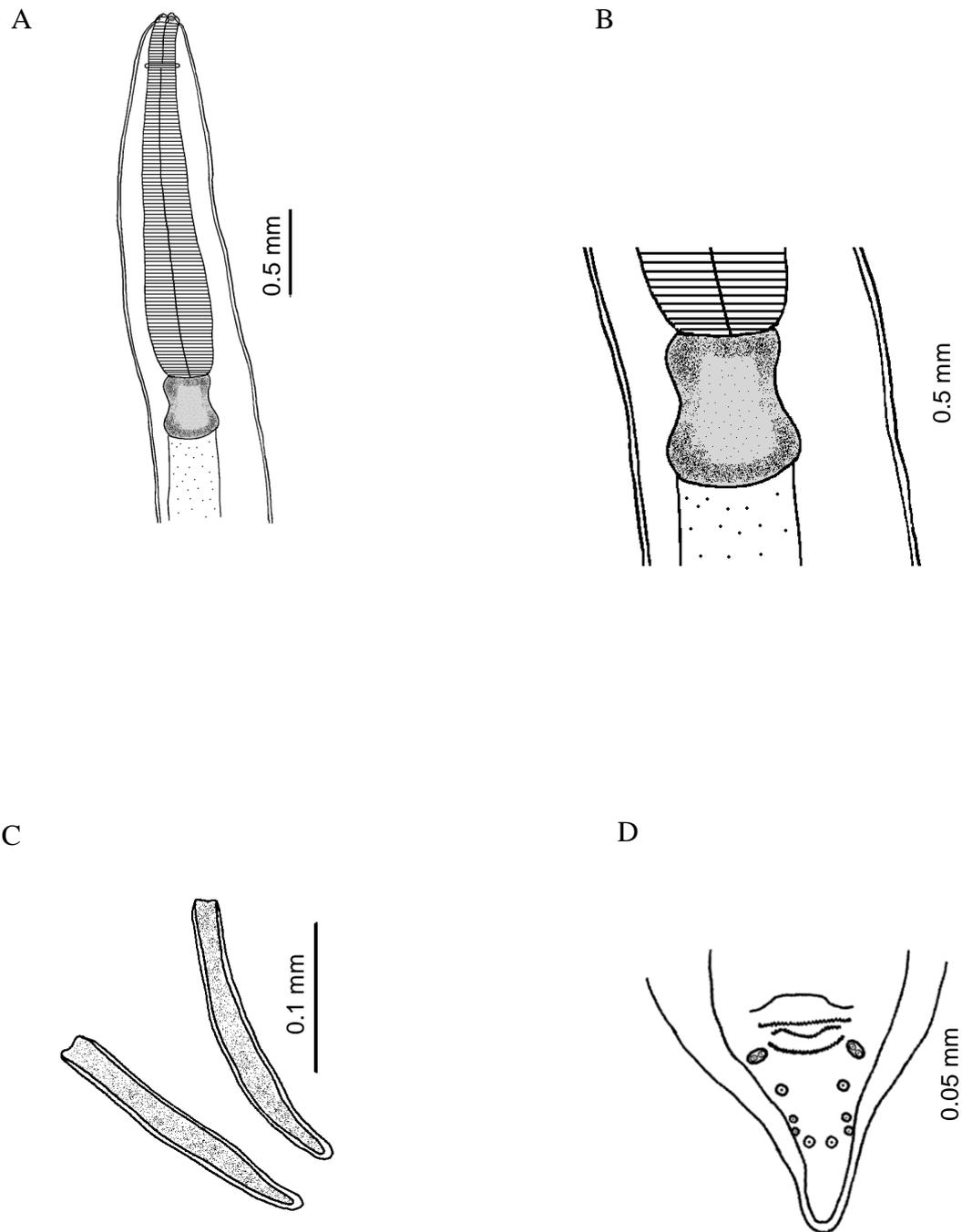


Figura 5.6: Detalhes morfológicos dos espécimes identificados como *Anisakis paggiae*. **A-** Porção anterior; **B-** Ventrículo; **C-** Espículos; **D-** Placas denticuladas e papilas caudais. Espécime 43.2.

5.2) Extração de DNA

Diferentes métodos de extração de DNA foram aplicados: kits comerciais das fabricantes Qiagen e Promega com modificações, o método fenol:clorofórmio e pré-tratamento com solução de CTAB. As concentrações de DNA obtidas com os diferentes métodos estão demonstradas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Concentrações de DNA (ng/μL) obtidas pelos diferentes métodos de extração de aplicados.

	AV 4.1	AV 6.2	AV 10.1	AV 13.2	AV 21.2	AV 23.2	AV 25.1
Fenol:Clorofórmio	7	3	4	12	8	4	6
Promega	4	15	8	5	3	6	4
Qiagen	11	8	9	12	9	10	12
Investigator	15	18	12	17	19	16	21
CTAB + Investigator	46	51	57	59	45	59	47

Promega: DNA IQ™ System (Promega); Qiagen: QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen); Investigator: QIAamp® DNA Investigator (Qiagen).

O teste de Friedman revelou um efeito significativo das diferentes técnicas na recuperação do DNA (Friedman qui-quadrado = 25.1799, $p < 0.01$). Os resultados obtidos a partir da análise *post-hoc* usando o teste de Wilcoxon estão mostrados na Tabela 5.3. A aplicação do método solução de CTAB + kit QIAamp® DNA Investigator (Qiagen) foi significativamente melhor ($p < 0.05$) que os outros métodos de extração. O método de Fenol:Clorofórmio e o kit comercial da Promega apresentaram o pior desempenho, enquanto que os kits da Qiagen se mostraram mais eficientes. A eficiência da solução de CTAB foi demonstrada quando comparada as concentrações obtidas utilizando o mesmo kit de extração (QIAamp® DNA Investigator) com e sem sua aplicação (Figura 5.7).

As demais amostras foram extraídas pela metodologia de melhor desempenho (CTAB + QIAamp® DNA Investigator) e concentrações DNA variaram de 18 – 236 ng/μL (Tabela 5.4). As amostras conservadas congeladas apresentaram concentrações consideravelmente superiores, 117, 189 e 236 ng/μL, enquanto que a maior para as amostras preservadas em solução foi de 62 ng/μL.

Tabela 5.3: Resultados da comparação de métodos de extração segundo o teste estatístico Post-hoc.

Resultados do Teste de Wilcoxon (valor p)				
	Fenol:Clorofómio	Promega	Qiagen	Investigator
Fenol:Clorofómio	-	-	-	-
Promega	0.84	-	-	-
Qiagen	0.03*	0.16	-	-
Investigator	0.016*	0.016*	0.016*	-
CTAB + Inv	0.016*	0.016*	0.016*	0.016*

*diferença significativa ($p < 0.05$). Promega: DNA IQ™ System (Promega); Qiagen: QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen); Inv: QIAamp® DNA Investigator (Qiagen).

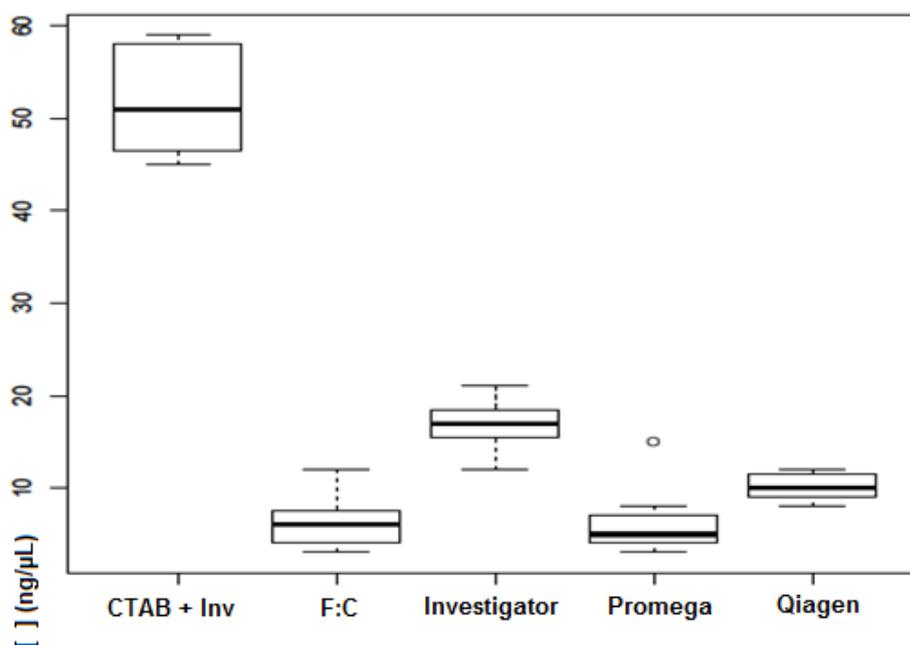


Figura 5.7. Boxplot de comparação da eficiência dos diferentes métodos de extração utilizados neste estudo. F:C: Fenol:Clorofómio; Promega: DNA IQ™ System (Promega); Qiagen: QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen); Investigator ou Inv: QIAamp® DNA Investigator (Qiagen).

Tabela 5.4: Concentrações de DNA das amostras extraídas neste estudo a partir do método de digestão com CTAB e extração com o Kit QIAamp® DNA Investigator

Amostra []	Amostra []	Amostra []	Amostra []
AV 1.1 24	AV 19.2 39	AV 32.1 22	AV 43.2 32
AV 1.2 35	AV 19.3 29	AV 32.2 38	AV 43.3 26
AV 1.3 21	AV 19.4 31	AV 32.3 25	AV 43.4 21
AV 2.1 21	AV 19.5 45	AV 33.1 47	AV 43.5 20
AV 2.2 26	AV 19.6 25	AV 33.2 24	AV 43.6 36
AV 2.3 26	AV 20.1 46	AV 33.3 48	AV 43.7 31
AV 3.1 82	AV 20.2 29	AV 33.4 27	AV 43.8 38
AV 3.2 65	AV 20.3 36	AV 33.5 46	AV 44.1 61
AV 4.1 46	AV 20.4 53	AV 34.1 51	AV 44.2 42
AV 4.2 20	AV 20.5 50	AV 34.2 24	AV 44.3 46
AV 4.3 27	AV 21.1 71	AV 34.3 36	AV 44.4 35
AV 5.1 18	AV 21.2 45	AV 34.4 22	AV 44.5 25
AV 6.1 20	AV 22.1 19	AV 35.1 46	AV 44.6 25
AV 6.2 51	AV 22.2 27	AV 35.2 44	AV 45.1 62
AV 6.3 18	AV 22.3 31	AV 35.3 25	AV 45.2 36
AV 7.1 19	AV 23.1 27	AV 35.4 32	AV 45.3 54
AV 7.2 24	AV 23.2 59	AV 35.5 32	AV 45.4 35
AV 8.1 29	AV 23.3 66	AV 35.6 23	AV 46.1 48
AV 9.1 22	AV 24.1 25	AV 36.1 44	AV 46.2 29
AV 10.1 57	AV 24.2 52	AV 36.2 28	AV 46.3 31
AV 10.2 24	AV 24.3 41	AV 36.3 34	AV 46.4 22
AV 10.3 21	AV 24.4 36	AV 36.4 27	AV 46.5 28
AV 10.4 26	AV 25.1 47	AV 37.1 24	AV 47.1 64
AV 11.1 83	AV 25.2 44	AV 37.2 26	AV 47.2 29
AV 12.1 37	AV 25.3 36	AV 37.3 31	AV 47.3 36
AV 12.2 15	AV 26.1 25	AV 37.4 19	AV 47.4 35
AV 13.1 42	AV 26.2 18	AV 38.1 47	AV 47.5 42
AV 13.2 59	AV 26.3 23	AV 38.2 51	AV 47.6 51
AV 13.3 54	AV 26.4 29	AV 38.3 36	AV 48.1 52
AV 14.1 37	AV 27.1 31	AV 38.4 36	AV 48.2 20
AV 14.2 29	AV 27.2 33	AV 38.5 55	AV 48.3 22
AV 14.3 24	AV 27.3 29	AV 39.1 30	AV 48.4 19
AV 14.4 21	AV 27.4 35	AV 39.2 23	AV 49 72
AV 14.5 32	AV 28.1 45	AV 39.3 22	AV 50.1 68
AV 14.6 23	AV 28.2 46	AV 39.4 19	AV 50.2 33
AV 15.1 45	AV 28.3 32	AV 39.5 26	AV 50.3 29
AV 15.2 32	AV 28.4 36	AV 40.1 25	AV 50.4 32
AV 15.3 21	AV 28.5 51	AV 40.2 31	AV 51 68
AV 15.4 46	AV 29.1 21	AV 40.3 24	AV 52.1 34
AV 16.1 28	AV 29.2 51	AV 40.4 41	AV 52.2 31
AV 16.2 29	AV 30.1 46	AV 41 62	AV 52.3 39
AV 16.3 19	AV 30.2 29	AV 42.1 56	AV 52.4 36
AV 17.1 21	AV 30.3 37	AV 42.2 35	AV 52.5 41
AV 17.2 32	AV 30.4 21	AV 42.3 23	AV 53 48
AV 17.3 23	AV 31.1 36	AV 42.4 29	AV 54 47
AV 17.4 27	AV 31.2 45	AV 42.5 42	AV 55 117
AV 18.1 32	AV 31.3 31	AV 42.6 44	AV 56 189
AV 18.2 29	AV 31.4 35	AV 42.7 38	AV 57 236
AV 19.1 35	AV 31.5 45	AV 43.1 21	

5.3) Amplificação Enzimática do DNA - Polimerização Reconstructora (PR).

O efeito da PR pôde ser observado quando se comparou a eficiência da PCR com o DNA submetido ou não à esta pre-amplificação. Como observado na Figura 5.8, quando a PR é aplicada, é possível observar bandas no gel (Figura 5.8b) que antes, sem esta etapa de pre-amplificação enzimática, não foram observadas (Figura 5.8a). A PR se mostrou então capaz de recuperar fitas íntegras de DNA.

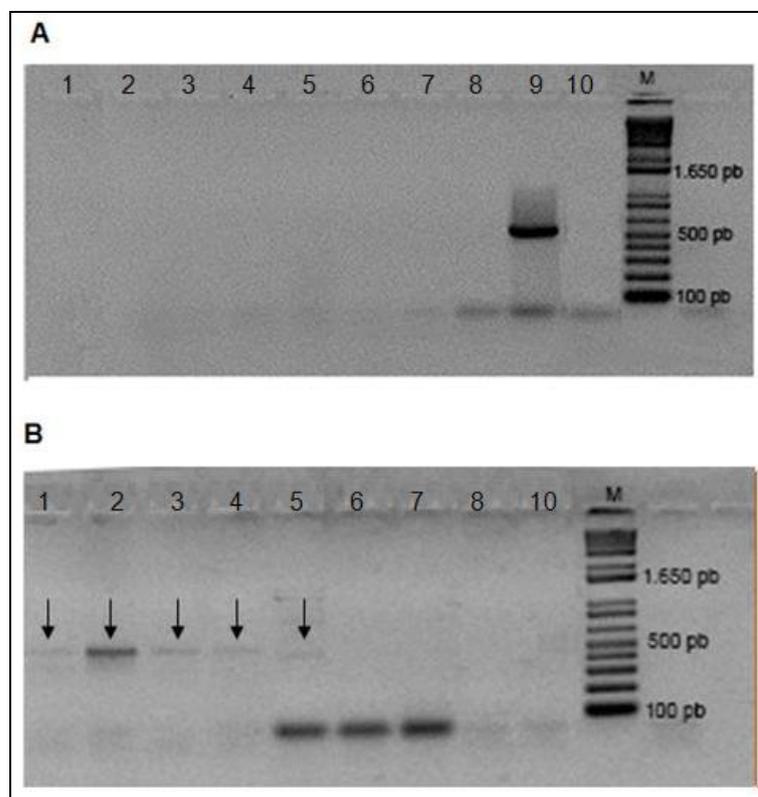


Figura 5.8: Resultados da eletroforese em gel 2% dos produtos da PCR para o gene ITS2 (~500pb) com aplicação da PR. (A) DNA sem PR. (B) DNA Submetido à PR. 1-9: amostras; 10: Controle negativo. M: Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

5.4) Amplificação do DNA e Análise de Sequências nucleotídicas

Todos os amplicons obtidos foram purificados, sequenciados, e inicialmente analisados no comando Pairwise/Blast/NCBI. A análise das regiões ITS e 18S rDNA revelou identidade com sequencias de *Anisakis* sp. especialmente nas amostras que estavam preservadas por congelamento, e conseqüentemente, com qualidade e concentração do DNA adequadas (117, 189 e 236 ng/ μ L). Entretanto, contaminação por fungos principalmente por *Malassezia* sp. (>95% de identidade com as sequencias de número de acesso: AY387145, HM014471, GU327516) e *Basidiomycete* sp. (>95% de identidade com AM901735, AM90173, AM902074) foram recorrentes quando aplicados os alvos moleculares ITS e 18S rDNA. A análise genética do gene mtDNA *cox2* revelou os amplicons de tamanho esperado com diversas intensidades de bandas (Figura 5.9). Entretanto, contaminações recorrentes por amplicons obtidos previamente ocorreram.

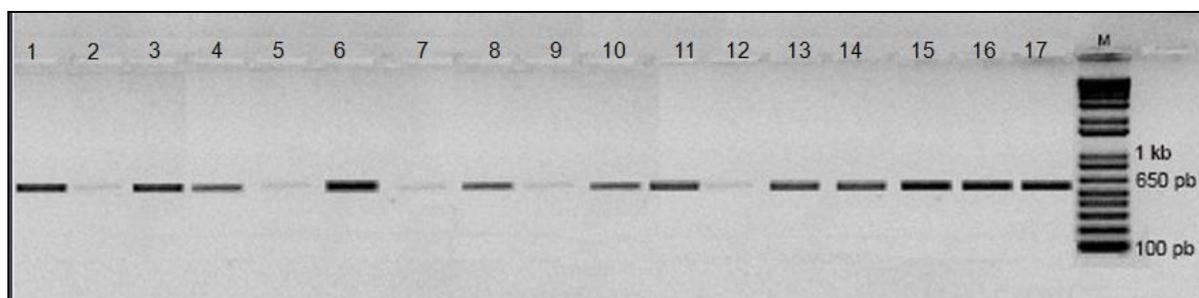


Figura 5.9: Resultados da eletroforese em gel 2% dos produtos da PCR purificados para o gene *cox2* (629pb). 1: AV 31; 2: AV 35; 3: AV38; 4: AV 41; 5: AV 42; 6: AV 44; 7: AV 45; 8: AV 46; 9: AV 47; 10: AV 49; 11: AV 50; 12: AV 51; 13: AV 53; 14: AV 54; 15: AV 55, 16: AV 56; 17: AV 57. Marcador: 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

5.5) Análise Genética

As comparações do Pairwise/Blast/NCBI com o banco de sequências do GenBank revelaram 97% -99% de similaridade com a espécie *Anisakis typica* para dezesseis espécimes (n=16) com base no gene *cox2* e 98%-99% de identidade com *Anisakis nascettii* para um espécime. Este espécime também foi caracterizado com base no 18S rDNA com 100% de similaridade com *Anisakis* sp. (U94365) e na região ITS, com 99% de similaridade com as sequências *Anisakis* sp MP-2005 (AY260555) e *Anisakis* sp TMTP-2003 (EU718477), submetidas nos anos citados no nome como tal e posteriormente identificadas como *A. nascettii* (Pontes et al.,2005; Mattiucci et al.,2009). Sequências de 4 espécimes obtiveram 98-99% de similaridade com *A. typica* baseado na região ITS-1 e uma sequência obteve 100% de similaridade também com *A. typica* baseado na região ITS-2. A análise do gene *cox1* de um espécime revelou identidade máxima de 87% com *Anisakis pegreffii* (FJ907317).

5.5.1) Análise do gene mtDNA *cox2*

Utilizando a sequência *A. simplex* C (JF423297) como referência o alinhamento das sequências do gene *cox2* (Figura 5.10) revelou seis assinaturas genéticas para *A. nascettii*- T248G, C264G, C364T, G373A e T504A G505T e dezessete- G83T, T84A, T87C, C88T, T141G, T175C, T204A, C205T, G261A, T393G, T404C, T423C, T492G, T495C, T496C, T531A, T543G para *A. typica*.

As distâncias genéticas interespecíficas entre as sequências de *A. typica* deste estudo e as demais espécies do gênero foram: *A. simplex* C 0.15, *A. simplex* (s.s) 0.15, *A. pegreffii* 0.14, *A. nascettii* 0.13, *A. ziphidarum* 0.16, *A. paggiae* 0.17, *A. physeteris* 0.16 e *A. brevispiculata* 0.20. A distância intraespecífica variou de 0.001-0.04, com uma média de 0.015 (DP 0.002). Para *A. nascettii*, as distâncias interspecíficas foram *A. simplex* C 0.16, *A. simplex* (s.s) 0.14, *A. pegreffii* 0.14, *A. typica* 0.15, *A. ziphidarum* 0.10, *A. paggiae* 0.15, *A. physeteris* 0.17 e *A. brevispiculata* 0.18. O intervalo de distância intraespecífica entre a sequência deste

estudo com as demais sequências de *A. nascettii* disponíveis no *GenBank* foi 0.018 – 0.024, com uma média de 0.01 (DP 0.002) (Tabela 5.5).

A distribuição das distâncias genéticas intra e interespecíficas de *A. typica* e *A. nascettii* identificados neste estudo revelou a existência de um *barcoding gap* (Figura 5.12).

A árvore K2P NJ revelou os espécimes deste estudo clusterizando com *A. typica* com um bootstrap de 100% (AV 31, AV 35, AV 38, AV 41, AV 42, AV 44, AV 45, AV 46, AV 47, AV 49, AV 50, AV 51, AV 53, AV 54, AV 55 e AV 57) e com *A. nascettii*, com um bootstrap de 99% (AV 56). Adicionalmente, os dois principais clados foram produzidos, as espécies do complexo *A. simplex* formam um grupo bem suportado (99% *bootstrap*) *A. typica* aparece em um clado isolado e um clado bem suportado (bootstrap=84%) pôde ser observado entre *A. nascettii* e *A. ziphidarum* (Figura 5.13).

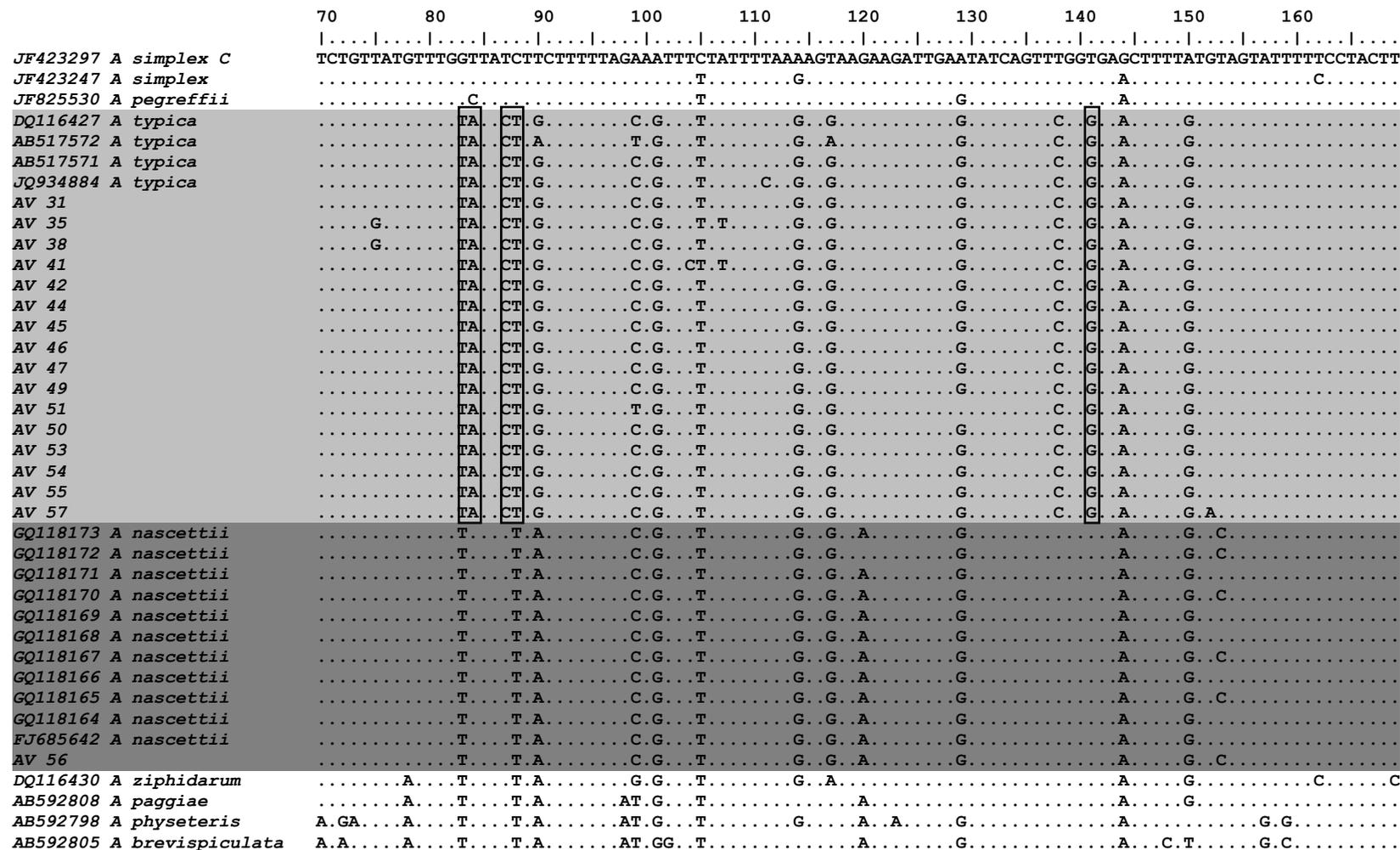


Figura 5.10. Alinhamento das seqüências nucleotídicas do gene *cox2* de *A. typica* e *A. nascettii* deste estudo (representadas por AV) com outras de *Anisakis* sp. retiradas do GenBank. Uma seqüência representativa de cada espécie e todas as seqüências disponíveis de *A. nascettii* e *A. typica* (08/2012) são mostradas. Pontos indicam identidade com a seqüência referência *A. simplex C* JF423297. As seqüências de *A. typica* estão destacadas em cinza claro e as de *A. nascettii* em cinza escuro. As assinaturas genéticas estão mostradas nos retângulos. *Continua*

	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
JF423297 <i>A simplex</i> C	T	A	A	T	T	T	T	T	T	T	T
JF423247 <i>A simplex</i>	T	A	A	T	T	T	T	T	T	T	T
JF825530 <i>A pegreffii</i>	T	A	A	T	T	T	T	T	T	T	T
DQ116427 <i>A typica</i>	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AB517572 <i>A typica</i>	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AB517571 <i>A typica</i>	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
JQ934884 <i>A typica</i>	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 31	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 35	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 38	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 41	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 42	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 44	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 45	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 46	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 47	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 49	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 51	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 50	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 53	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 54	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 55	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
AV 57	C	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A
GQ118173 <i>A nascettii</i>	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A	T
GQ118172 <i>A nascettii</i>	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A	T
GQ118171 <i>A nascettii</i>	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A	T
GQ118170 <i>A nascettii</i>	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A	T
GQ118169 <i>A nascettii</i>	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A	T
GQ118168 <i>A nascettii</i>	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A	T
GQ118167 <i>A nascettii</i>	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A	T
GQ118166 <i>A nascettii</i>	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A	T
GQ118165 <i>A nascettii</i>	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A	T
GQ118164 <i>A nascettii</i>	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A	T
FJ685642 <i>A nascettii</i>	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A	T
AV 56	G	C	A	C	A	T	G	C	G	A	T
DQ116430 <i>A ziphidarum</i>	T	A	A	T	T	T	T	T	T	T	T
AB592808 <i>A paggiae</i>	A	G	T	T	A	T	C	T	A	T	G
AB592798 <i>A phyteteris</i>	G	A	A	A	A	T	T	G	C	T	T
AB592805 <i>A brevispiculata</i>	G	C	A	A	A	A	A	T	T	G	C

Continuação Figura 5.10

	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
JF423297 <i>A simplex</i> C	GTGGTATTGGAGTTATGAGTTTAGGGATATTCCTGGTTTGGAAATTTGATTCTTATATGAAGTCTGTAGATCAGTTAGAGTTAGGTGAGCCTCGTCPTTTTG									
JF423247 <i>A simplex</i>C.....T.....G.....C.....A.....G.....G.....G.....G.....G.....
JF825530 <i>A pegreffii</i>C.....G.....C.....A.....G.....C.....G.....C.....G.....C.....
DQ116427 <i>A typica</i>A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....G.....
AB517572 <i>A typica</i>A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....G.....
AB517571 <i>A typica</i>A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....C.....A.....T.....
JQ934884 <i>A typica</i>A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....C.....T.....G.....
AV 31A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....G.....
AV 35C.....A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....
AV 38C.....A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....
AV 41C.....A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....
AV 42C.....A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....
AV 44C.....A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....C.....
AV 45C.....A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....
AV 46C.....A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....
AV 47C.....A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....
AV 49C.....A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....
AV 51A.....A.....T.....C.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....
AV 50A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....G.....
AV 53A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....C.....
AV 54A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....G.....
AV 55A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....G.....G.....
AV 57A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....C.....G.....
GQ118173 <i>A nascettii</i>A.....A.....T.....C.....A.....G.....A.....T.....A.....G.....
GQ118172 <i>A nascettii</i>A.....A.....T.....C.....A.....G.....A.....T.....A.....G.....
GQ118171 <i>A nascettii</i>A.....A.....T.....C.....G.....A.....G.....T.....A.....G.....
GQ118170 <i>A nascettii</i>A.....A.....T.....C.....A.....G.....A.....T.....A.....G.....
GQ118169 <i>A nascettii</i>A.....A.....T.....C.....A.....G.....A.....T.....A.....G.....
GQ118168 <i>A nascettii</i>A.....A.....C.....C.....A.....G.....A.....T.....A.....G.....
GQ118167 <i>A nascettii</i>A.....A.....T.....C.....A.....G.....A.....T.....A.....G.....
GQ118166 <i>A nascettii</i>A.....A.....T.....C.....C.....A.....G.....T.....A.....G.....
GQ118165 <i>A nascettii</i>A.....A.....T.....C.....A.....G.....A.....T.....A.....G.....
GQ118164 <i>A nascettii</i>A.....A.....T.....C.....A.....G.....A.....T.....A.....G.....
FJ685642 <i>A nascettii</i>A.....A.....C.....C.....A.....G.....A.....T.....A.....G.....
AV 56A.....A.....T.....C.....A.....G.....A.....T.....A.....G.....
DQ116430 <i>A ziphidarum</i>	A.....	A.....T.....G.....A.....G.....G.....G.....G.....A.....
AB592808 <i>A paggiae</i>	A.....	A.....A.....T.....C.....C.....A.....G.....G.....G.....
AB592798 <i>A physeteris</i>	A.....A.....A.....A.....A.....A.....G.....G.....G.....A.....
AB592805 <i>A brevispiculata</i>	A.....A.....G.....T.....GC.....A.....G.....A.....A.....G.....

Continuação Figura 5.10

	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460
JF423297 <i>A simplex</i> C	GAGGTTGATAATCGT	TGTGTGTTCCCTTG	TGATATTAATGTCG	TTTTTGTATTACTT	CTGGGGACGTTATT	CATTCTTGGGCTTT	GCCGAGAATGTCTA			
JF423247 <i>A simplex</i>					C		G	T		T
JF825530 <i>A pegreffii</i>			C		T		G	T		T
DQ116427 <i>A typica</i>		C	G	C	A	T	C	G	T	C
AB517572 <i>A typica</i>		C	G	C	CA	T	C	C	G	T
AB517571 <i>A typica</i>		C	G	C	A	T	C	C	G	T
JQ934884 <i>A typica</i>		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 31		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 35		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 38		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 41		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 42		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 44		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 45		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 46		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 47		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 49		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 51		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 50		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 53		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 54		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 55		C	G	C	A	T	C	C	G	T
AV 57		C	G	C	CA	T	C	C	G	T
GQ118173 <i>A nascettii</i>	A		C		A	T		C	T	
GQ118172 <i>A nascettii</i>	A		C		A	T		C	T	
GQ118171 <i>A nascettii</i>	A		C		A	T		C	T	
GQ118170 <i>A nascettii</i>	A		C		A	T		C	T	
GQ118169 <i>A nascettii</i>	A		C		A	T		C	T	
GQ118168 <i>A nascettii</i>	A		C		A	T		C	T	
GQ118167 <i>A nascettii</i>	A		C	C	A	T		C	T	
GQ118166 <i>A nascettii</i>	A		C	C	A	T		C	T	
GQ118165 <i>A nascettii</i>	A		C		A	T		C	T	
GQ118164 <i>A nascettii</i>	A		C		A	T		C	T	
FJ685642 <i>A nascettii</i>	A		C		A	T		C	T	
AV 56	A		C	C	A	T		C	T	
DQ116430 <i>A ziphidarum</i>	G		A		A	C		T	C	T
AB592808 <i>A paggiae</i>		G	G		A	T		C	T	T
AB592798 <i>A physeteris</i>			G		CA	T		G	T	T
AB592805 <i>A brevispiculata</i>	G		G		A	T		T	A	A

Continuação Figura 5.10

	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570
JF423297 <i>A simplex</i> C	TTAAGTTGGATGCTATAAGGGGTATTTTGCCTACTGTTTCTATAGTTTTCCTACTGTTGGTGT	TTTTTATGGTCAATGTTTCAGAAATTTG	GGGGCTAATCATAG								
JF423247 <i>A simplex</i>											
JF825530 <i>A pegreffii</i>			C . G . T	A			A	G		G	C
DQ116427 <i>A typica</i>	C	G	G	CC	T	C	A	G	A	C	G
AB517572 <i>A typica</i>		G	G	CC	T	C	A	G	A	C	G
AB517571 <i>A typica</i>	C	G	G	CC	T	T	A	G	A	C	G
JQ934884 <i>A typica</i>	C	G	G	CC	T	C	A	G	A	C	G
AV 31	C	G	G	CC	T	C	A	G	A	C	G
AV 35	C	C	G	G	CC	T	C	A	G	A	C
AV 38	C	C	G	G	CC	T	C	A	G	A	C
AV 41	C	C	G	G	CC	T	C	A	G	A	C
AV 42	C	G	G	CC	T	C	A	G	A	C	G
AV 44	C	C	G	G	CC	T	C	A	G	A	C
AV 45	C	C	G	G	CC	T	C	A	G	A	C
AV 46	C	C	G	G	CC	T	C	A	G	A	C
AV 47	C	C	G	G	CC	T	C	A	G	A	C
AV 49	C	C	G	G	CC	T	C	A	G	A	C
AV 51	C	G	G	CC	C	C	A	G	A	C	G
AV 50	C	G	G	CC	C	C	A	G	A	C	G
AV 53	CC	G	G	G	CC	T	C	A	T	A	G
AV 54	C	G	G	CC	T	C	A	G	A	C	G
AV 57	C	G	G	CC	T	C	A	G	A	C	G
GQ118173 <i>A nascettii</i>	G	A	C	A	AT	A	C	G	A	C	G
GQ118172 <i>A nascettii</i>	G	A	C	A	AT	A	C	G	A	C	G
GQ118171 <i>A nascettii</i>	G	A	C	A	AT	A	C	G	A	C	G
GQ118170 <i>A nascettii</i>	G	A	C	A	AT	A	C	G	A	C	G
GQ118169 <i>A nascettii</i>	G	A	C	A	AT	A	C	G	A	C	G
GQ118168 <i>A nascettii</i>	G	A	C	A	AT	A	C	G	A	C	G
GQ118167 <i>A nascettii</i>	G	A	C	A	AT	A	C	G	A	C	G
GQ118166 <i>A nascettii</i>	G	A	C	A	AT	A	C	G	A	C	G
GQ118165 <i>A nascettii</i>	G	A	C	A	AT	A	C	G	A	C	G
GQ118164 <i>A nascettii</i>	G	A	C	A	AT	A	C	G	A	C	G
FJ685642 <i>A nascettii</i>	G	A	C	A	AT	A	C	G	A	C	G
AV 56	T	T	G	A	A	AT	A	G	A	C	G
DQ116430 <i>A ziphidarum</i>	A	G	A	T	G		G	G	G	C	G
AB592808 <i>A paggiae</i>	AC	T	A	A	T	A	C	A	T	A	C
AB592798 <i>A physeteris</i>	AC	T	G		T	G	A	G	G	T	G
AB592805 <i>A brevispiculata</i>	AC	T	A		T	A	A	G	G	T	

Continuação Figura 5.1

Continuação Figura 5.11.

	140	150	160	170	180	190	200
JF423297_A_simplex_C	E	V	D	N	R	C	V
JF423247_A_simplex	I	N	V	R	F	C	I
JF825530_A_pegreffii	T	S	G	D	V	I	H
DQ116427_A_typica	S	W	A	L	P	S	M
AB517572_A_typica	S	I	K	L	D	A	M
AB517571_A_typica	S	G	I	L	S	T	V
JQ934884_A_typica	S	S	F	P	T	V	G
AV_31	V	F	Y	G	Q	C	S
AV_35	E	I	C	G	A	N	H
AV_38
AV_41	T	I
AV_42	T	I
AV_44	T	I
AV_45	T	I
AV_46	T	I
AV_47	T	I
AV_49	T	I
AV_51	T	I
AV_50	T	I
AV_53	T	I
AV_54	T	I
AV_55	T	I
AV_57	T	I
GQ118173_A_nascettii	I
GQ118172_A_nascettii	I
GQ118171_A_nascettii	I
GQ118170_A_nascettii	I
GQ118169_A_nascettii	I
GQ118168_A_nascettii	I
GQ118167_A_nascettii	I
GQ118166_A_nascettii	I
GQ118165_A_nascettii	I
GQ118164_A_nascettii	I
FJ685642_A_nascettii	I
AV_56	I
DQ116430_A_ziphidarum	I
AB592808_A_paggiae	I
AB592798_A_physeteris	I
AB592805_A_brevispiculata	I

Tabela 5.5. Distâncias genéticas entre as sequências do gene mtDNA *cox2* de *Anisakis* disponíveis no banco (n=247) e aquelas incluídas neste estudo (*). A média do número de substituições de base por sítio entre os grupos são mostradas. As análises foram conduzidas usando o modelo K2P, no software MEGA 5.

Espécies	<i>A. simplex C</i>	<i>A. simplex (s.s)</i>	<i>A. pegreffii</i>	<i>A. typica</i>	<i>A. typica*</i>	<i>A. nascettii</i>	<i>A. nascettii*</i>	<i>A. ziphidarum</i>	<i>A. paggiae</i>	<i>A. physeteris</i>
<i>A. simplex (s.s)</i>	0.06									
<i>A. pegreffii</i>	0.07	0.05								
<i>A. typica</i>	0.15	0.15	0.14							
<i>A. typica*</i>	0.15	0.15	0.14	0.02						
<i>A. nascettii</i>	0.15	0.14	0.14	0.13	0.13					
<i>A. nascettii*</i>	0.16	0.14	0.14	0.15	0.15	0.02				
<i>A. ziphidarum</i>	0.14	0.12	0.13	0.16	0.16	0.10	0.10			
<i>A. paggiae</i>	0.14	0.14	0.14	0.17	0.17	0.14	0.15	0.12		
<i>A. physeteris</i>	0.15	0.14	0.14	0.16	0.16	0.16	0.17	0.15	0.13	
<i>A. brevispiculata</i>	0.17	0.16	0.16	0.19	0.20	0.18	0.18	0.14	0.12	0.11

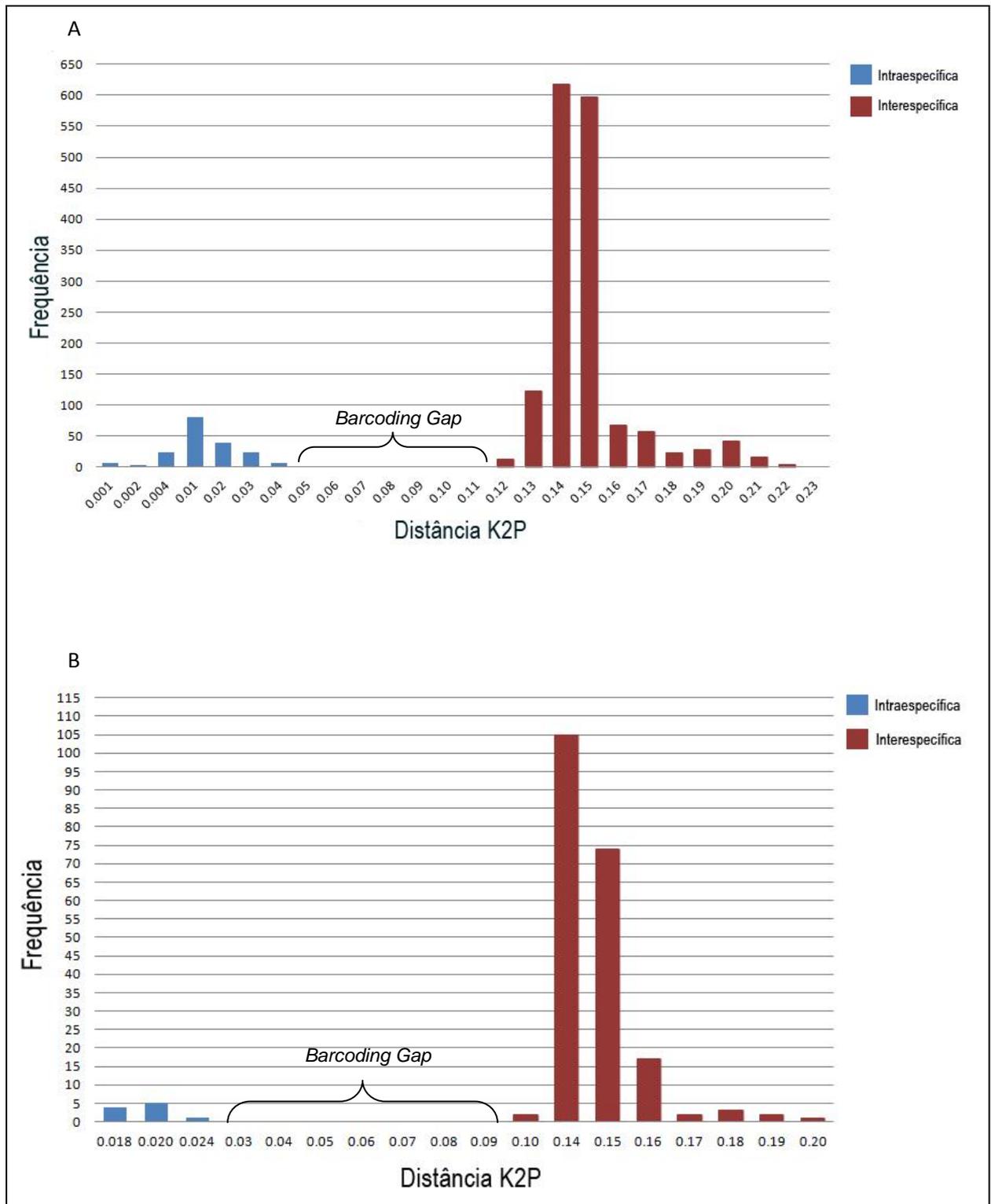


Figura 5.11: Distribuição das distâncias genéticas intraespecífica e interespecífica do gene *cox2* das sequências de *Anisakis* spp. disponíveis no banco e as das espécies identificadas neste estudo. A: *A. typica*, B: *A. nascettii*. O intervalo de *barcoding gap* é mostrado. K2P: Kimura-2-Parâmetros.

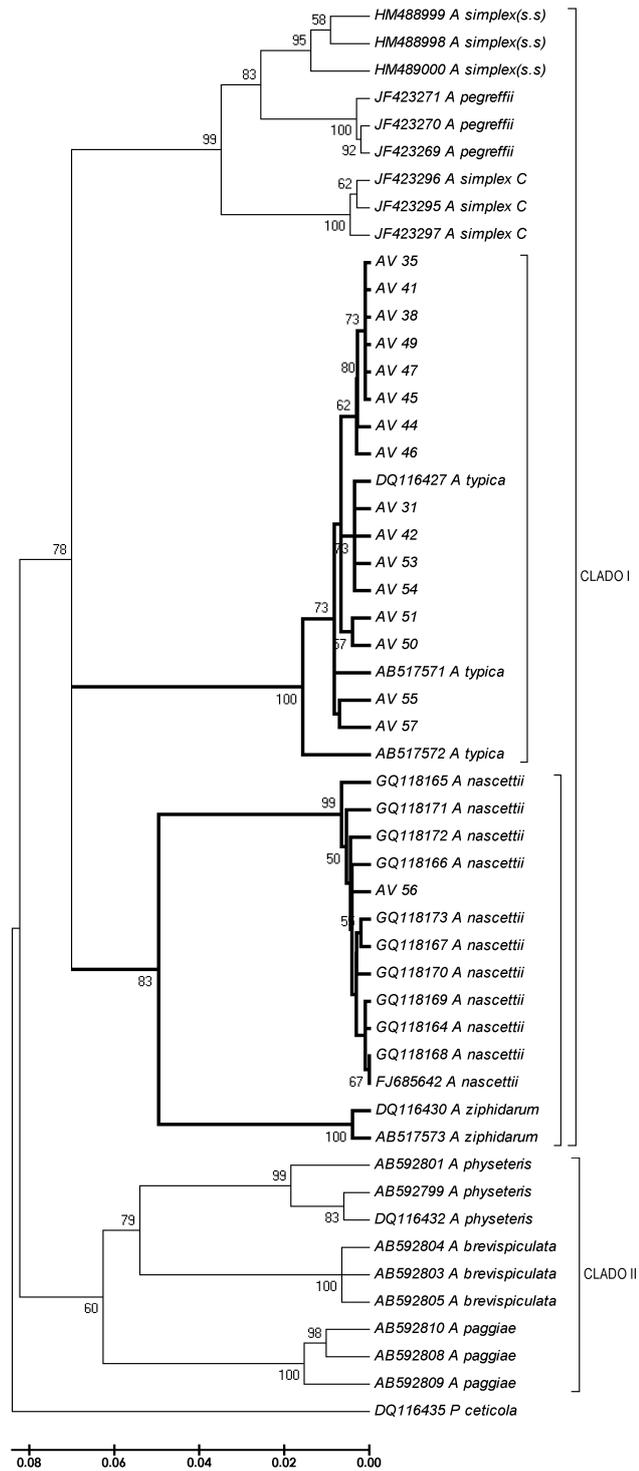


Figura 5.13: Árvore filogenética Neighbour-Joining inferida a partir de seqüências do gene *cox2* (n= 51) de *Anisakis* spp. As análises foram conduzidas no MEGA v.5, usando o modelo K2P e 1000 replicatas de *bootstrap*. Amostras AV correspondem aos espécimes deste estudo. Os grupos monofiléticos *A. typica* e *A. nascettii* estão destacados em negrito. *Pseudoterranova ceticola* é o grupo externo.

5.5.2) Análise da região ITS

O espécime identificado como *A. nascettii* (AV 56) pelo marcador *cox2*, foi também analisado pelas regiões ITS e 18S rDNA. O alinhamento da região ITS (Figura 5.14), utilizando a sequência *A. simplex* GQ472930 como referência, revelou 20 assinaturas genéticas, C75T, T185A, T287A, G618C, C642G, T730C, A745G, A746C, T774C, A775T, G817A, A827G, G829A, A837T, del847T, G875A, C921T, G922A, G923T, T950A. As distâncias genéticas interespecíficas entre nossa sequência de *A. nascettii* e os demais grupos do gênero foram: Complexo *A. simplex* 0.04, *A. typica* 0.12, *A. ziphidarum* 0.03, *A. physeteris* 0.10, *A. brevispiculata* e *A. paggiae* 0.08 (Tabela 5.6). A distância intraespecífica com as outras duas sequências de *A. nascetti* disponíveis, *Anisakis* sp. MP-2005 e *Anisakis* sp. TMTP-200, foram 0.001 e 0.003, respectivamente. A árvore filogenética gerada (Figura 5.15) mostra nosso espécime clusterizando com alto valor de *bootstrap* (99%) com as sequências de *A. nascettii* e formando um grupo com *A. ziphidarum*. As espécies do complexo *A. simplex* não foram diferenciadas por este marcador.

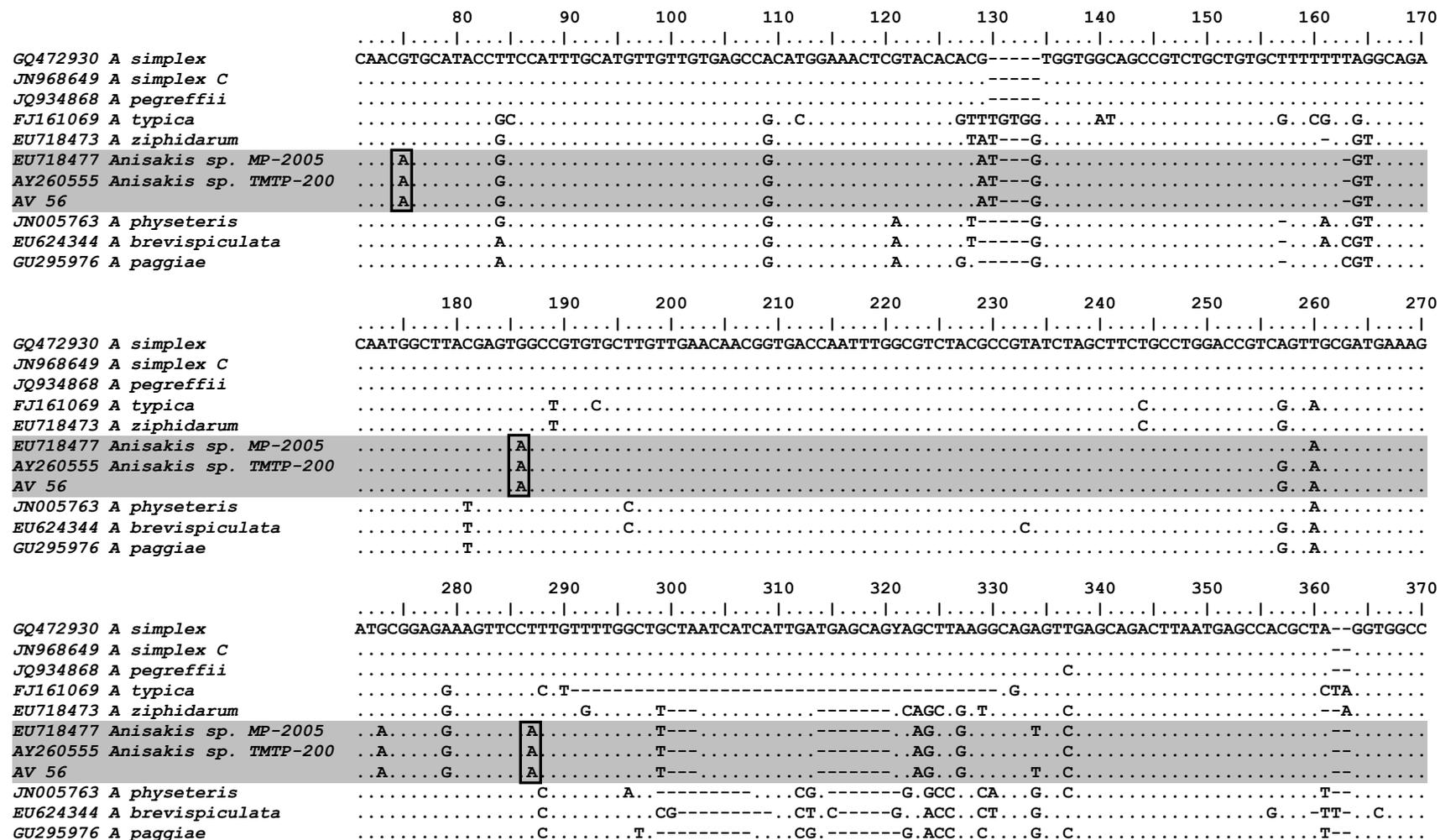


Figura 5.14. Alinhamento das sequências nucleotídicas da região ITS de *A. nascettii* deste estudo (AV 56) com outras de *Anisakis* sp. retiradas do GenBank. Uma sequência representativa de cada espécie e todas as sequências disponíveis de *A. nascettii* (08/2012) são mostradas. Pontos indicam identidade com a sequência referência *A. simplex* GQ472930. As sequências de *nascettii* estão destacadas em cinza. As assinaturas genéticas estão mostradas nos retângulos. *Continua*

	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	
GQ472930 <i>A simplex</i>	GCCAAAACCCAAACACCAACCGGTCT---ATTTGACATTGTTATTTTCATTGT--ATGTGTTGAAAATGTACAAATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTCC									
JN968649 <i>A simplex C</i>									
JQ934868 <i>A pegreffii</i>									
FJ161069 <i>A typica</i>G.....C.AAT.G.AGTC.....-----G...-A..TT.....									
EU718473 <i>A ziphidarum</i>									
EU718477 <i>Anisakis sp. MP-2005</i>									
AY260555 <i>Anisakis sp. TMTP-200</i>									
AV 56									
JN005763 <i>A physeteris</i>									
EU624344 <i>A brevispiculata</i>									
GU295976 <i>A paggiae</i>									
	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	
GQ472930 <i>A simplex</i>	TGGATCGATGAAGAACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTGCAACGCACATTGCGCTATCGGGTTCATTC									
JN968649 <i>A simplex C</i>									
JQ934868 <i>A pegreffii</i>									
FJ161069 <i>A typica</i>									
EU718473 <i>A ziphidarum</i>									
EU718477 <i>Anisakis sp. MP-2005</i>									
AY260555 <i>Anisakis sp. TMTP-200</i>									
AV 56									
JN005763 <i>A physeteris</i>									
EU624344 <i>A brevispiculata</i>									
GU295976 <i>A paggiae</i>									
	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	
GQ472930 <i>A simplex</i>	CCGATGGCACGCTGGCTGAGGTCGAATTACGGTGAAGTCTTTCACGGT-----TTTTCT-----GRACGTGAAGCATTCCGGCAAGCAATTGCTGT									
JN968649 <i>A simplex C</i>									
JQ934868 <i>A pegreffii</i>									
FJ161069 <i>A typica</i>									
EU718473 <i>A ziphidarum</i>									
EU718477 <i>Anisakis sp. MP-2005</i>									
AY260555 <i>Anisakis sp. TMTP-200</i>									
AV 56									
JN005763 <i>A physeteris</i>									
EU624344 <i>A brevispiculata</i>									
GU295976 <i>A paggiae</i>									

Continuação Figura 5.14.

	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770
GQ472930 <i>A simplex</i>	TGTGTTGTTG	-----GTGATTCT-ATCATG-GACA--	ATATGACGAGC---	GGTTCCCTTGCTTAGTGATGACAAAAGAA---	GACGTCA---	ACACCGA				
JN968649 <i>A simplex C</i>	-----	-----	-----	-----	M.---	-----	-----	-----	-----	-----
JQ934868 <i>A pegreffii</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
FJ161069 <i>A typica</i>	C.....	CTTAAG	CGA.-TGA.C-.G..CCGCGC..	AC.ACAC..C.....	T-..	TG.CA..-AA.....	CCGC.....	C.		
EU718473 <i>A ziphidarum</i>	-----	A.---A.-TGAG.C-..	-----	G.AC--AC.....	-----	T...AG.G.AG.A--	-----	-----	-----	-----
EU718477 <i>Anisakis sp. MP-2005</i>	-----	A.---A.-GA.C-..	-----	G.C.T-..	C	-----	-----	GC.AG--A.A.-----	GT.A.	
AY260555 <i>Anisakis sp. TMTP-200</i>	-----	A.---A.-GA.C-N..	-----	G.C.T-..	C	-----	-----	GC.AG--A.A.-----	GT.A.	
AV 56	-----	A.---A.-GA.C-..	-----	G.C.T-..	C	-----	-----	GC.AG--A.A.-----	GT.A.	
JN005763 <i>A physeteris</i>	C.....	GTTG--CGG...TTGA.CG.T.GATTGGC.G.TC.AC--	-----	C.....	-----	-----	-----	TC.TGTGTG..G.---	-----	-----
EU624344 <i>A brevispiculata</i>	-----	GTCG--CGG...TCGG.CG.T.GATTG.CAG.AT.AT--	-----	C.....	-----	-----	-----	TG.TGTGTG.AG.---	T-----	-----
GU295976 <i>A paggiae</i>	-----	GTCG--T.CG...GTTCG---AT.GGTTGGCA.TAT.AC--	-----	C.....	-----	-----	-----	TG.TGTG--AT.---	T-----	-----

	780	790	800	810	820	830	840	850	860	870
GQ472930 <i>A simplex</i>	ATCTACTATACT-ACTAATACTAGTATATAGGTGAGGTGCT-TTTGGTG-GTCACAAAAGTGACA-AGTATGCCATTTCATAGGGGCAACACCAGCATA									
JN968649 <i>A simplex C</i>	-----	G.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
JQ934868 <i>A pegreffii</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
FJ161069 <i>A typica</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
EU718473 <i>A ziphidarum</i>	C.....	G.....G.....	-----	T-..	-----	A..	-----	-----	-----	-----
EU718477 <i>Anisakis sp. MP-2005</i>	CA.CT	-----G.G.-----	A.....	T-G.A.	-----	G.A.	-----	G-T.	-----	-----
AY260555 <i>Anisakis sp. TMTP-200</i>	CN.CT	-----A.G.-----	A.....	T-G.A.	-----	G.A.	-----	G-T.	-----	-----
AV 56	CA.CT	-----G.G.-----	A.....	T-G.A.	-----	G.A.	-----	G-T.	-----	-----
JN005763 <i>A physeteris</i>	C.....	AC.G..CGA---CGG.G----	A.AT.G-G--	-A.G.....	C.A.-----	C.....	-----	-----	-----	-----
EU624344 <i>A brevispiculata</i>	C.....	AC.G..CGG---CGG.G----	A.AT.G-G--	-A.G.....	C.G.-----	C.....	-----	-----	-----	-----
GU295976 <i>A paggiae</i>	C.....	AC.G..CTA..TGCGG.G----	A.AT.G-G--	..G.....	C.G.-----	GC.....	-----	-----	-----	-----

	880	890	900	910	920	930	940	950	960
GQ472930 <i>A simplex</i>	CGT-GATAA---	GT-TGG-CTGGTTGATGAAACG---	GCAACGGAATGACGGA-CGTCT---	ATGTGATCAAAAA-TGATACTATTTGACCTCAGC					
JN968649 <i>A simplex C</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A.....	-----
JQ934868 <i>A pegreffii</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
FJ161069 <i>A typica</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
EU718473 <i>A ziphidarum</i>	A.---	-----	-----	-----	-----	A.G.---	-----	T.TA.....	-----
EU718477 <i>Anisakis sp. MP-2005</i>	TA	-----G.....	-----	TAT	-----G.---	-----	-----	A.T.TA.....	-----
AY260555 <i>Anisakis sp. TMTP-200</i>	GTA	-----G.....	-----	TAT	-----G.---	-----	-----	A.T.TA.....	-----
AV 56	TA	-----G.....	-----	TAT	-----G.---	-----	-----	A.T.TA.....	-----
JN005763 <i>A physeteris</i>	-----G.---	T--G.....	CT.TTG.....	G.....	-----G.....	GG.....	C.T.TG.....	-----	-----
EU624344 <i>A brevispiculata</i>	-----G.---	T--G.....	CT.TTG.....	G.....	-----G.....	G-G.AC.T.TG.....	-----	-----	-----
GU295976 <i>A paggiae</i>	-----G..TGACAA..T--G.....	CT.TTG.....	A..G.....	TG--G.AACGG..C.....	G..-C.T.TG.....	-----	-----	-----	-----

Continuação Figura 5.14.

Tabela 5.6: Distâncias genéticas entre as sequências da região ITS completa das espécies de *Anisakis* disponíveis no banco (n=441) e sequencia de *Anisakis nascettii* identificada neste estudo (*). A média do número de substituições de base por sítio entre os grupos são mostradas. As análises foram conduzidas no software MEGA 5, usando o modelo K2P.

Espécies	<i>A. simplex (s.s)</i>	<i>A. simplex C</i>	<i>A. pegreffii</i>	<i>A. typica</i>	<i>A. ziphidarum</i>	<i>A. nascettii</i>	<i>A. nascettii*</i>	<i>A. physeteris</i>	<i>A. brevispiculata</i>
<i>A. simplex C</i>	0.00								
<i>A. pegreffii</i>	0.00	0.00							
<i>A. typica</i>	0.13	0.13	0.13						
<i>A. ziphidarum</i>	0.04	0.04	0.04	0.11					
<i>A. nascettii</i>	0.04	0.04	0.04	0.12	0.03				
<i>A. nascettii*</i>	0.04	0.04	0.04	0.12	0.03	0.00			
<i>A. physeteris</i>	0.09	0.09	0.09	0.14	0.10	0.09	0.10		
<i>A. brevispiculata</i>	0.10	0.10	0.10	0.14	0.11	0.10	0.10	0.02	
<i>A. paggiae</i>	0.08	0.08	0.08	0.13	0.09	0.08	0.08	0.04	0.04

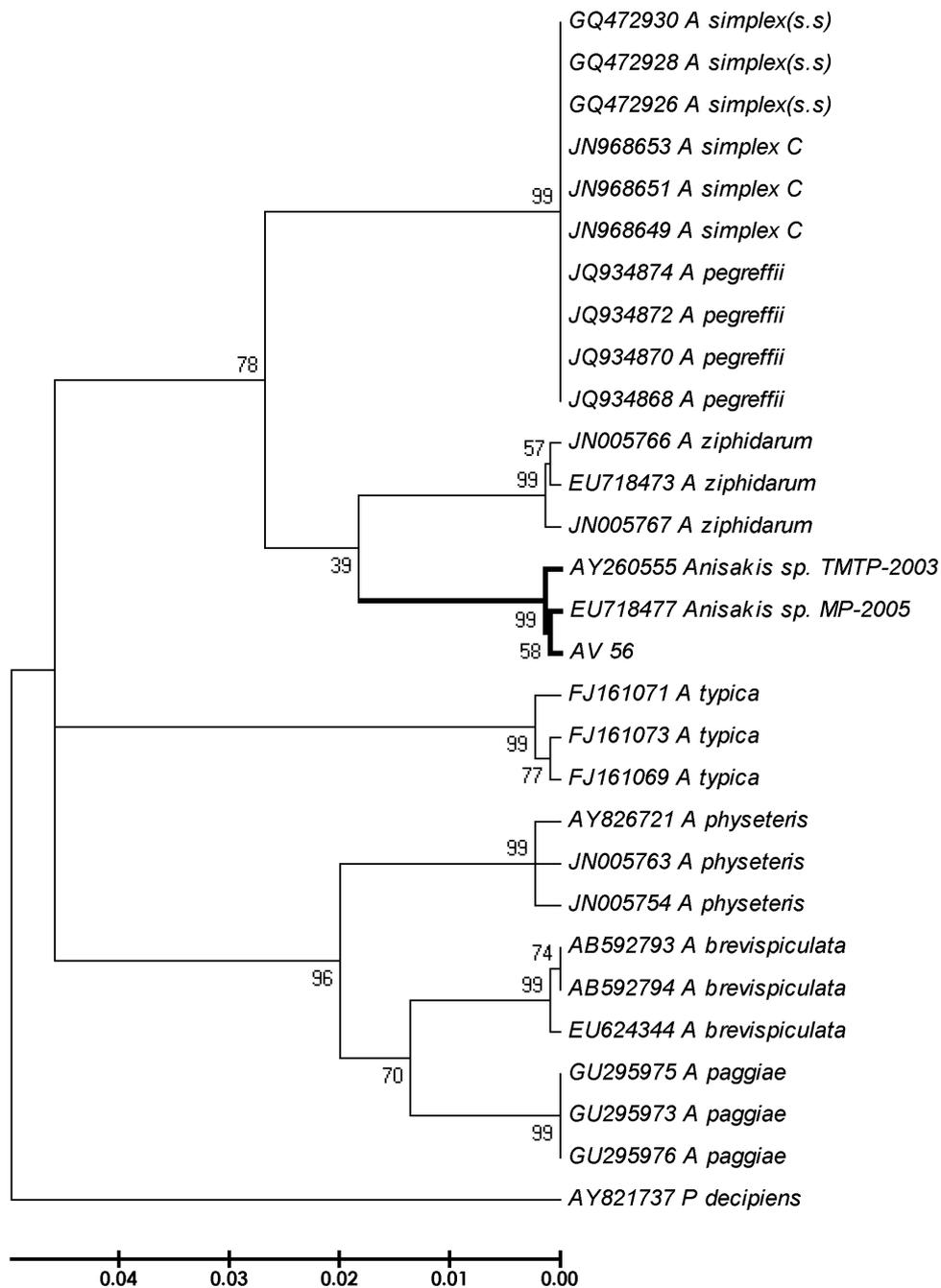


Figura 5.15: Árvore filogenética Neighbour-Joining inferida a partir de sequências do da região ITS (n= 28) de *Anisakis* spp. As análises foram conduzidas no MEGA v.5, usando o modelo K2P e 1000 replicatas de *bootstrap*. Amostras AV correspondem aos espécimes deste estudo. O grupo monofilético de *A. nassettii* está destacado em negrito. *Pseudoterranova ceticola* é o grupo externo.

Quatro espécimes (AV 31.2, AV33.2, AV36.1 e AV 54) foram identificados como *A. typica* a partir da análise da região ITS-1. O alinhamento (Figura 5.16) revelou 13 assinaturas genéticas, A269G, A303C, A304G, A307C, G323A, del324T, del325C, del326A, T335A, G336A, T337C, A352G, A379G. As distâncias interespecíficas foram: Complexo *A. simplex* 0.13, *A. ziphidarum* 0.10, *A. nascettii* 0.13, *A. brevispiculata* 0.14 e *A. paggiae* 0.13. A distância intraespecífica variou de 0.00 até 0.01 (Tabela 5.7). A árvore filogenética gerada revelou os espécimes deste estudo agrupados com *A. typica* em um clado bem suportado (*bootstrap* 99%) (Figura 5.17).

	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	
JN968652 <i>A simplex</i> C	ATTTGTACATTTTCAACA--CATACAATGAAATAACAATGTCAAATAGACCGGTTGTGTTTTGGGTTTTGGCGGCCACCTAG--CGTGGCTCATTAAGTC										
JQ934877 <i>A simplex</i>										
JN968632 <i>A pegreffii</i>										
AY826724 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
FJ161074 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
AB432908 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
AB429051 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
JN968964 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
FJ161071 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
EU327687 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
FJ161068 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
JQ798962 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
AB479120 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
JN968962 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
EU346092 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
EU327688 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
EU327689 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
JN005760 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
JN005762 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
EU327686 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
EU718476 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
FJ161070 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	T	C	-A	TT	AG
FJ161069 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	T	C	-A	TT	AG
FJ161072 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
FJ161073 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
FJ161067 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
FJ161066 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
FN391887 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
EU346093 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
EU346091 <i>A typica</i>	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
AV31.2	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
AV33.2	AA	GT	--TCA	TCG	----	A	C	-A	TT	C	AG
AV36.1	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
AV54	AA	T	--TCA	TC	----	A	C	-A	TT	C	AG
JN005766 <i>A ziphidarum</i>A.T.---										
EU718477 <i>Anisakis sp.MP-2005</i>A.T.---										
GU295976 <i>A paggiae</i>	AA	TA	TGTTA	..	CAT	CGA				A	--
AB592793 <i>A brevispiculata</i>	AA	TA	TGTCA	GCAT	CTG				T	G	A.--C
JN005754 <i>A physeteris</i>	AA	GTA	TGTCA	GCAT	CTG				T	A	--

Figura 5.15. Alinhamento das sequências nucleotídicas da região ITS-1 de *A. typica* deste estudo (AV) com outras de *Anisakis* sp. retiradas do GenBank. Uma sequência representativa de cada espécie e 27 de *A typica* disponíveis no banco são mostradas. Pontos indicam identidade com a sequência referência *A. simplex* C JN68652. As sequências de *A. typica* estão destacadas em cinza. As assinaturas genéticas estão mostradas nos retângulos. *Continua*

	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210
JN968652 <i>A simplex</i> C	TGCTCAACTCTGCCTTAAGCTGCTGCTCATCAATGATGATTAGCAGCCAAAACAAGGAACTTTCTCCGCATCTTTCATCGCAACTGACGGTCCAGGCAG									
JQ934877 <i>A simplex</i>										
JN968632 <i>A pegreffii</i>										
AY826724 <i>A typica</i>										
FJ161074 <i>A typica</i>										
AB432908 <i>A typica</i>										
AB429051 <i>A typica</i>										
JN968964 <i>A typica</i>										
FJ161071 <i>A typica</i>										
EU327687 <i>A typica</i>										
FJ161068 <i>A typica</i>										
JQ798962 <i>A typica</i>										
AB479120 <i>A typica</i>										
JN968962 <i>A typica</i>										
EU346092 <i>A typica</i>										
EU327688 <i>A typica</i>										
EU327689 <i>A typica</i>										
JN005760 <i>A typica</i>										
JN005762 <i>A typica</i>										
EU327686 <i>A typica</i>										
EU718476 <i>A typica</i>										
FJ161070 <i>A typica</i>										
FJ161069 <i>A typica</i>										
FJ161072 <i>A typica</i>										
FJ161073 <i>A typica</i>										
FJ161067 <i>A typica</i>										
FJ161066 <i>A typica</i>										
FN391887 <i>A typica</i>										
EU346093 <i>A typica</i>										
EU346091 <i>A typica</i>										
AV31.2										
AV33.2										
AV36.1										
AV54										
JN005766 <i>A ziphidarum</i>										
EU718477 <i>Anisakis sp.MP-2005</i>										
GU295976 <i>A paggiae</i>										
AB592793 <i>A brevispiculata</i>										
JN005754 <i>A physeteris</i>										

Continuação Figura 5.15.

	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310
JN968652 <i>A simplex C</i>	AA-GCTAGATACGGCGTAGACGCCAAATTGGTCACCGTTGTTCAACAAGCA-CACGG-CCACTCGTAAGCCATTGTCTGCCTAAAAAAGCACAGCAGAC									
JQ934877 <i>A simplex</i>	..-.....					- A -				
JN968632 <i>A pegreffii</i>	..-.....									
AY826724 <i>A typica</i>	..-.....					GG A G			C CG C	
FJ161074 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
AB432908 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
AB429051 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
JN968964 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
FJ161071 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
EU327687 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
FJ161068 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
JQ798962 <i>A typica</i>	..-.....	A GA A				G A -			C CG C	
AB479120 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
JN968962 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
EU346092 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
EU327688 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
EU327689 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
JN005760 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
JN005762 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
EU327686 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
EU718476 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
FJ161070 <i>A typica</i>	..-.....					G A - T			C CG C	
FJ161069 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
FJ161072 <i>A typica</i>	..-.....					G A - T			C CG C	
FJ161073 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
FJ161067 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
FJ161066 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
FN391887 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
EU346093 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
EU346091 <i>A typica</i>	..-.....					G A -			C CG C	
AV31.2	..-.....					G A -			C CG C	
AV33.2	..-.....		T			G A -			C CG C	
AV36.1	..-.....					G A -			C CG C	
AV54	..-.....					G A -			C CG C	
JN005766 <i>A ziphidarum</i>	..-.....					- A -			AC	-
EU718477 <i>Anisakis sp.MP-2005</i>	..-.....					- T			AC	-
GU295976 <i>A paggiae</i>	..-.....					- A			ACG	-
AB592793 <i>A brevispiculata</i>	..-.....	G				G -	A		AC T	-
JN005754 <i>A physeteris</i>	..-.....					G -	A		AC T	-

Continuação Figura 5.15.

Tabela 5.7: Distâncias genéticas entre as sequências da região ITS-1 das espécies de *Anisakis* disponíveis no banco (n=441) e sequencia de *Anisakis typica* identificada neste estudo (*). A média do número de substituições de base por sítio entre os grupos são mostradas. As análises foram conduzidas no software MEGA 5, usando o modelo K2P.

Espécies	<i>A. simplex</i> (s.s)	<i>A. simplex</i> C	<i>A. pegreffii</i>	<i>A. ziphidarum</i>	<i>A. nascettii</i>	<i>A. typica</i>	<i>A. typica</i> *	<i>A. physeteris</i>	<i>A. brevispiculata</i>
<i>A. simplex</i> C	0.00								
<i>A. pegreffii</i>	0.00	0.00							
<i>A. ziphidarum</i>	0.04	0.04	0.04						
<i>A. nascettii</i>	0.05	0.05	0.04	0.03					
<i>A. typica</i>	0.12	0.12	0.13	0.10	0.12				
<i>A. typica</i> *	0.13	0.13	0.13	0.10	0.13	0.00			
<i>A. physeteris</i>	0.11	0.10	0.10	0.10	0.10	0.13	0.13		
<i>A. brevispiculata</i>	0.12	0.11	0.12	0.11	0.12	0.14	0.14	0.02	
<i>A. paggiae</i>	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.13	0.13	0.04	0.04

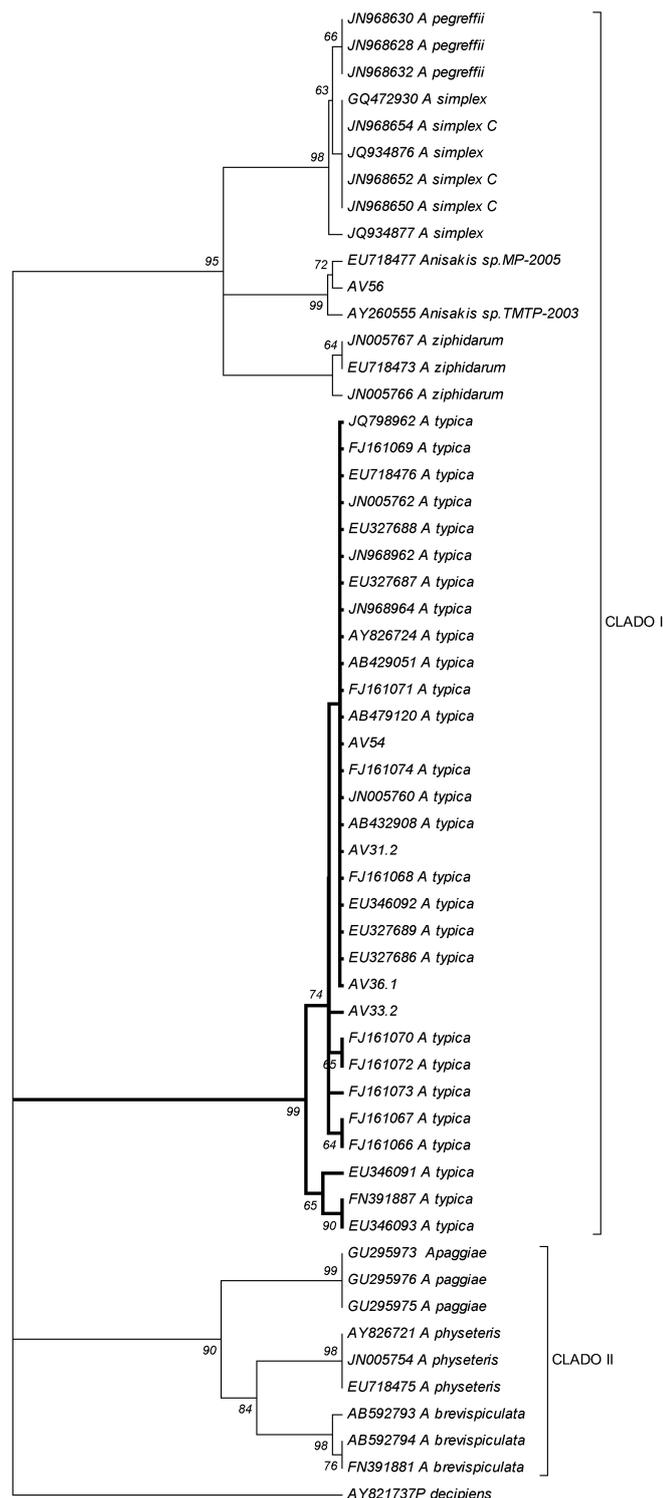


Figura 5.17: Árvore filogenética Neighbour-Joining inferida a partir de sequências do da região ITS-1 (n= 59) de *Anisakis* spp. As análises foram conduzidas no MEGA v.5, usando o modelo K2P e 1000 replicatas de *bootstrap*. Amostras AV correspondem aos espécimes deste estudo. O grupo monofilético de *A. typica* está destacado em negrito. *Pseudoterranova decipiens* é o grupo externo.

Adicionalmente, o espécime AV 54 foi também identificado como *A. typica* a partir da análise da região ITS-2. As assinaturas genéticas estão mostradas na Figura 5.18. As distâncias interespecíficas foram: Complexo *A. simplex* 0.27, *A. nascettii* 0.29, *A. ziphidarum* 0.33, *A. physeteris* 0.33, *A. brevispiculata* 0.32 e *A. paggiae* 0.32. A distância intraespecífica variou de 0.001 até 0.002 (Tabela 5.8). A árvore gerada mostrou o espécime AV 54 incluído no grupo de *A. typica* com um bootstrap de 98% (Figura 5.19).

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
JQ934876 A. simplex (s.s)  CGATAAAATAGTGCGAATTGCAGACACATTGAGCACTAAGAATTCGAACGCACATTGCGCTATCGGGTTCATCCCGATGGCACGCTGGCTGAGGGTCGA
JN968653 A. simplex C
JQ934867 A. pegreffii
JQ934866 A. typica
AB479120 A. typica
AB432908 A. typica
AY826724 A. typica
JN968960 A. typica
JN968958 A. typica
JN968956 A. typica
JN968954 A. typica
JN968952 A. typica
JN968950 A. typica
AV 54
AY260555 Anisakis sp. TMTP-200 .N
EU718473 A. ziphidarum
JN968637 A. physeteris C
GU295975 A. paggiae
AB592793 A. brevispiculata

          110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
JQ934876 A. simplex (s.s)  ATTACGGTGAAGTGTCTTCACG-GTTTTTCTG-----GACTGTGAAGCATTTCG-GCAAGCAATT----GCTGTTGTG--TTG--TTGGTGATTCT
JN968653 A. simplex C
JQ934867 A. pegreffii
JQ934866 A. typica
AB479120 A. typica
AB432908 A. typica
AY826724 A. typica
JN968960 A. typica
JN968958 A. typica
JN968956 A. typica
JN968954 A. typica
JN968952 A. typica
JN968950 A. typica
AV 54
AY260555 Anisakis sp. TMTP-200
EU718473 A. ziphidarum
JN968637 A. physeteris
GU295975 A. paggiae
AB592793 A. brevispiculata

```

Figura 5.18. Alinhamento das sequências nucleotídicas da região ITS-2 de *A. typica* deste estudo (AV 54) com outras de *Anisakis* sp. retiradas do *GenBank*. Uma sequência representativa de cada espécie e 10 sequências de *A. typica* são mostradas. Pontos indicam identidade com a sequência referência *A. simplex* (s.s) JQ934866. As sequências de *A. typica* estão destacadas. As assinaturas genéticas estão mostradas nos retângulos.

```

                210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
JQ934876 A. simplex (s.s) ATC-----ATGGACAATATGACGAGCGGTTCCCTTAGTGATGACAA-AAGAAGACGTCA---ACACCGAATCTACTATACTACTAATACTAGTATAT
JN968653 A. simplex C      .-----M-----T-----G...
JQ934867 A. pegreffii      .-----M-----T-----G...
JQ934866 A. typica        ..GG-CACC.CG.G.C.C..AC--.....TTGATG.C.A.....CCGC.....C.CG.CTGC..AACACT.G...AGCTG
AB479120 A. typica        ..GG-CACC.CG.G.C.C..AC--.....TTGATG.C.A.....CCGC.....C.CG.CTGC..AACACT.G...AGCTG
AB432908 A. typica        ..GG-CACC.CG.G.C.C..AC--.....TTGATG.C.A.....CCGC.....C.CG.CTGC..AACACT.G...AGCTG
AY826724 A. typica        ..GG-CACC.CG.G.C.C..AC--.....TTGATG.C.A.....CCGC.....C.CG.CTGC..AACACT.G...AGCTG
JN968960 A. typica        ..GG-CACC.CG.G.C.C..AC--.....TTGATG.C.A.....CCGC.....C.CG.CTGC..AACACT.G...AGCTG
JN968958 A. typica        ..GG-CACC.CG.G.C.C..AC--.....TTGATG.C.A.....CCGC.....C.CG.CTGC..AACACT.G...AGCTG
JN968956 A. typica        ..GG-CACC.CG.G.C.C..AC--.....TTGATG.C.A.....CCGC.....C.CG.CTGC..AACACT.G...AGCTG
JN968954 A. typica        ..GG-CACC.CG.G.C.C..AC--.....TTGATG.C.A.....CCGC.....C.CG.CTGC..AACACT.G...AGCTG
JN968952 A. typica        ..GG-CACC.CG.G.C.C..AC--.....TTGATG.C.A.....CCGC.....C.CG.CTGC..AACACT.G...AGCTG
JN968950 A. typica        ..GG-CACC.CG.G.C.C..AC--.....TTGATG.C.A.....CCGC.....C.CG.CTGC..AACACT.G...AGCTG
AV 54          ..GG-CACC.CG.G.C.C..AC--.....TTGATG.C.A.....CCGC.....C.CG.CTGC..AACACT.G...AGCTG
AY260555 Anisakis sp. TMTP-200 ..-----N.....G.....T.....C.....T.....GC.....A.A.G---T.A-----N.CTC...A.G-----
EU718473 A. ziphidarum      G-----G.ACA.....T...AG.G.....C.....G.....G...
JN968637 A. physeteris     ..GGTCG.T.G.GGCTC.....C.....TG.TGTGT-G.G.....G.ACG-----
GU295975 A. paggiae        ---ATCGG.T.G.....C.....TG.TG--T-G.AT.....T.....G.ACT-----
AB592793 A. brevispiculata -.GGTCG.T...GC...T---.C.....TG.TGTGT-G.AG.....T.....G.ACG-----

```

```

                310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
JQ934876 A. simplex (s.s) AGGTGAGGTGCTTTTGG---TGGTC-ACAAAAGTGACA-AGTAT-GCCATTTTCATAGGGGCAACAACCAGCATACG-TGATAA-----GTTGGCTG
JN968653 A. simplex C      .-----GTTGGCTG-----
JQ934867 A. pegreffii      .-----GTTGGCTG-----
JQ934866 A. typica        GT.CTA.A.G.G...GTG.A.TTTG.TGGTCACA.A..GCC.....T.....TCT..G.TACTAGTAG.....
AB479120 A. typica        GT.CTA.A.G.G...GTG.A.TTTG.TGGTCACA.A..GCC.....T.....TCT..G.TACTAGTAG.....
AB432908 A. typica        GT.CTA.A.G.G...GTG.A.TTTG.TGGTCACA.A..GCC.....T.....TCT..G.TACTAGTAG.....
AY826724 A. typica        GT.CTA.A.G.G...GTG.A.TTTG.TGGTCACA.A..GCC.....T.....TCT..G.TACTAGTAG.....
JN968960 A. typica        GT.CTA.A.G.G...GTG.A.TTTG.TGGTCACA.A..GCC.....T.....TCT..G.TACTAGTAG.....
JN968958 A. typica        GT.CTA.A.G.G...GTG.A.TTTG.TGGTCACA.A..GCC.....T.....TCT..G.TACTAGTAG.....
JN968956 A. typica        GT.CTA.A.G.G...GTG.A.TTTG.TGGTCACA.A..GCC.....T.....TCT..G.TACTAGTAG.....
JN968954 A. typica        GT.CTA.A.G.G...GTG.A.TTTG.TGGTCACA.A..GCC.....T.....TCT..G.TACTAGTAG.....
JN968952 A. typica        GT.CTA.A.G.G...GTG.A.TTTG.TGGTCACA.A..GCC.....T.....TCT..G.TACTAGTAG.....
JN968950 A. typica        GT.CTA.A.G.G...GTG.A.TTTG.TGGTCACA.A..GCC.....T.....TCT..G.TACTAGTAG.....
AV 54          GT.CTA.A.G.G...GTG.A.TTTG.TGGTCACA.A..GCC.....T.....TCT..G.TACTAGTAG.....
AY260555 Anisakis sp. TMTP-200 .A.....G.A---.G.A...GGT.....G.A.....
EU718473 A. ziphidarum      .-----A-----
JN968637 A. physeteris     ---AC...A.A.....A.-G.....C.A.....C.....TGTG.TG-----C...T..
GU295975 A. paggiae        ---.C...A.A.....-G.....C.G.-...GC.....G.TGT.G.CAAGTTG--.C...T..
AB592793 A. brevispiculata ----.C...A.A......A.-G.....C.G.-...C.....TATG.TG-----C...T..

```

Continuação Figura 5.17

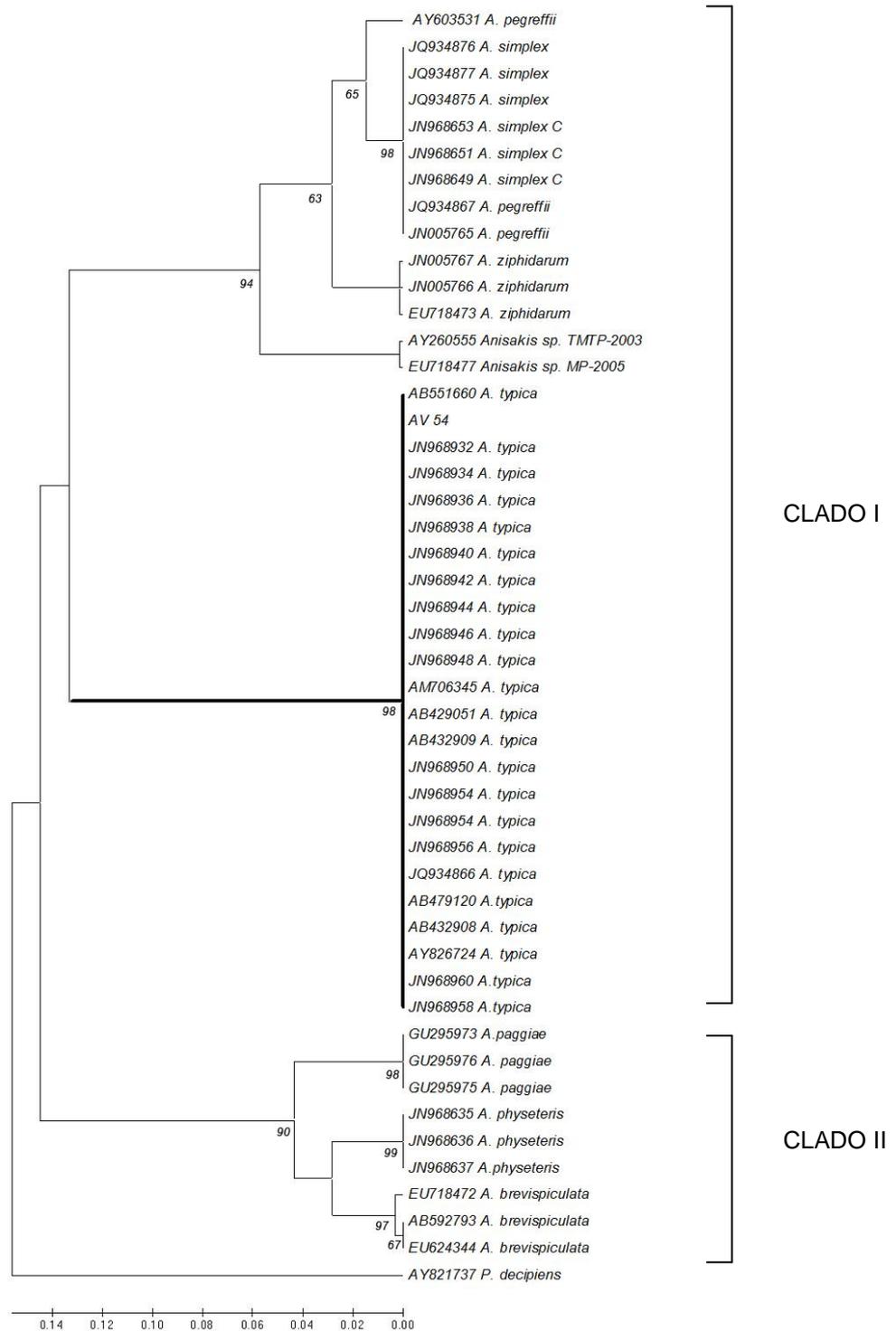


Figura 5.19: Árvore filogenética Neighbour-Joining inferida a partir de sequências do da região ITS-2 (n= 48) de *Anisakis* spp. As análises foram conduzidas no MEGA v.5, usando o modelo K2P e 1000 replicatas de *bootstrap*. Amostras AV correspondem aos espécimes deste estudo. O grupo monofilético de *A. typica* está destacado em negrito. *Pseudoterranova decipiens* é o grupo externo.

5.5.3) Análise do gene 18S rDNA.

O alinhamento das sequências da região 18S rDNA não revelou assinaturas genéticas (Figura 5.20). Não é possível identificar a espécie de *Anisakis* por este marcador, apenas definir seu gênero. A matriz de distância comparando os gêneros *Anisakis*, *Pseudoterranova* e *Contracaecum* revelou limitada capacidade discriminatória do marcador (Tabela 5.9). A árvore filogenética gerada mostra o espécime AV 56 clusterizando com *Anisakis* sp. (Figura 5.21).

Tabela 5.9: Distâncias genéticas entre as sequências do gene 18S rDNA dos gêneros *Anisakis* sp. (n=6), *Pseudoterranova* sp. (n=1) e *Contracaecum* sp. (n=4) disponíveis no banco e a sequência de *A. nascettii* deste estudo (*). A média do número de substituições de base por sítio entre os grupos são mostradas. As análises foram conduzidas no software MEGA v. 5, usando o modelo K2P.

Gênero	<i>Anisakis</i> sp.	<i>A nascettii</i> *	<i>Pseudoterranova</i> sp.
<i>Anisakis</i> sp.			
<i>A. nascettii</i> *	0.01		
<i>Pseudoterranova</i> sp.	0.01	0.01	
<i>Contracaecum</i> sp.	0.03	0.04	0.03

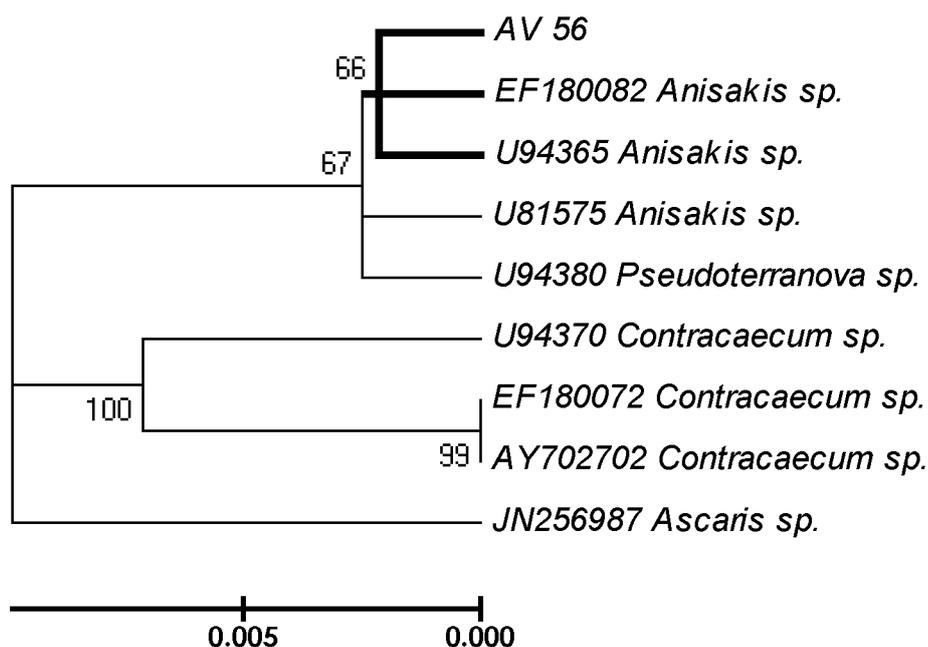


Figura 5.21. Árvore filogenética Neighbour-Joining inferida a partir de sequências do gene 18S rDNA (n=9) de *Anisakis* spp., *Pseudoterranova* sp. e *Contracacaecum* spp. As análises foram conduzidas no MEGA v.5, usando o modelo K2P e 1000 replicatas de *bootstrap*. O espécime deste estudo é o AV 56. *Ascaris* sp. é o grupo externo.

5.5.4) Análise do gene *cox1*.

Um espécime previamente analisado e identificado como *A. typica* pelo marcador *cox2*, teve um fragmento de 185pb do gene *cox1* gerado e sua sequência analisada. Não é possível aferir assinaturas genéticas no alinhamento, pois não existem sequências depositadas deste gene de todas as espécies de *Anisakis* disponíveis são apenas das espécies *A. pegreffii* e *A. physeteris*, e do complexo *A. simplex*, (Figura 5.22). A distância interespecífica com estas três espécies foram 0.11, 0.09 e 0.11, respectivamente (Tabela 5.10). Não foi possível definir distância intraespecífica, pois não existem sequências de *A. typica* depositadas para este gene. A árvore filogenética gerada é pouco informativa, e mostra um clado formado por *A. simplex* e nosso espécime agrupando com *A. pegreffii* (Figura 5.23).

Tabela 5.10: Distâncias genéticas entre as sequências do gene *cox1* disponíveis no banco (*A. simplex* 14, *A. pegreffii* 2, *A. physeteris* 1) e a sequência de *A. typica* deste estudo (*). A média do número de substituições de base por sítio entre os grupos são mostradas. As análises foram conduzidas no software MEGA 5, usando o modelo K2P.

Espécie	<i>A. simplex</i>	<i>A. pegreffii</i>	<i>A. physeteris</i>
<i>A. simplex</i>			
<i>A. pegreffii</i>	0.13		
<i>A. physeteris</i>	0.03	0.13	
<i>A. typica</i> *	0.11	0.09	0.11

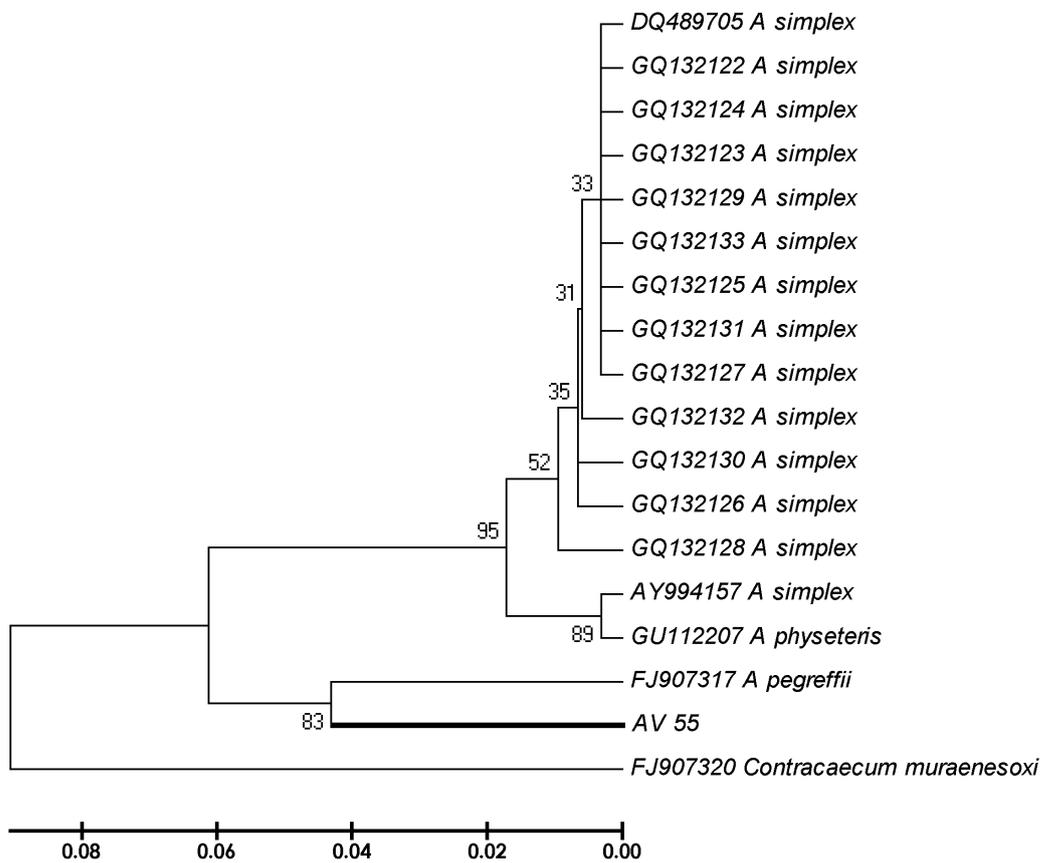


Figura 5.23. Árvore filogenética Neighbour-Joining inferida a partir de sequências do gene *cox1* (n= 17) *Anisakis* spp. As análises foram conduzidas no MEGA v.5, usando o modelo K2P e 1000 replicatas de *bootstrap*. AV 55 corresponde ao espécime deste estudo. *Contracaecum muraenesoxi* é o grupo externo.

5.6) Depósito de espécimes e sequências

Espécimes identificados morfologicamente como *A. paggiae* foram depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz, sob a numeração 35796a e 35796b e aqueles identificados morfologicamente e geneticamente como *A. typica*, com os registros 35806a, 35806b, 35806c, 35807a, 35807b, 35807c, 35808, 35809a, 35809b.

As sequências do gene *cox2* de *A. nascetti* e *A. typica* foram depositadas no GenBank com o número de acesso JQ010980 e JQ859920 – JQ859932, respectivamente. As sequências dos genes 18S rDNA e ITS de *A. nascettii* também foram depositadas no banco internacional de sequências, números de acesso JX486103 e JX486104, respectivamente.

Tabela 5.11. Resultados obtidos neste estudo a partir das análises morfológica e genética. F-Fêmea; M-Macho; L-Larva; I-Indeterminado; ND: Não determinado.

Espécime	Estágio /Sexo	Hospedeiro	Localização	Identificação Morfológica	Identificação Genética
AV 1	F	<i>Sotalia guianensis</i>	Salvador, BA	<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 2	F	<i>Sotalia guianensis</i>	Camaçari, BA	<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 5	F	<i>Sotalia guianensis</i>	Camaçari, BA	<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 12.2	F	<i>Sotalia guianensis</i>	Rio Tinto, PB	<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 14.4	F	<i>Kogia breviceps</i>	Cascavél, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado II	ND
AV 14.5	F			<i>Anisakis</i> sp. clado II	ND
AV 14.6	M			<i>Anisakis paggiae</i>	ND
AV 15.2	F	<i>Kogia simus</i>	Camaçari, BA	<i>Anisakis</i> sp. clado II	ND
AV 15.3	F			<i>Anisakis</i> sp. clado II	ND
AV 15.4	F			<i>Anisakis</i> sp. clado II	ND
AV 16.1	F	<i>Peponocephala electra</i>	Fortaleza, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 16.2	F			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 16.3	F			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 17.1	F	<i>Kogia breviceps</i>	Aracati, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado II	ND
AV 17.2	M			<i>Anisakis paggiae</i>	ND
AV 18.2	L	<i>Kogia simus</i>	L. Freitas, BA	<i>Anisakis</i> sp. clado II	ND
AV 19.1	F	<i>Stenella clymene</i>	Beberibe, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 19.3	F			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 19.4	L			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 19.5	L			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 19.7	F			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 20.1	F	<i>Stenella longirostris</i>	Aquiraz, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 20.2	F			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 20.3	F			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 20.4	M			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 20.5	F			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 22.1	F	<i>Stenella longirostris</i>	Aquiraz, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 22.3	F			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 24.3	F	<i>Stenella clymene</i>	Maragogi, AL	<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 24.4	F			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 25.1	M	<i>Steno bredanensis</i>	Maceió, AL	<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 26.1	F	<i>Kogia breviceps</i>	Valença, BA	<i>Anisakis</i> sp. clado II	ND
AV 26.2	M			<i>Anisakis paggiae</i>	ND
AV 26.3	F			<i>Anisakis</i> sp. clado II	ND
AV 27.1	F	<i>Stenella longirostris</i>	Macau, RN	<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 27.2	M			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 28.1	F	<i>Stenella clymene</i>	Salvador, BA	<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 28.4	F			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 30.1	F	<i>Stenella clymene</i>	Paracuru, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 30.3	F			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 30.5	M			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 31.1	F	<i>Peponocephala electra</i>	Aquiraz, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I	<i>A. typica</i>
AV 31.5	M			<i>Anisakis</i> sp. clado I	

Espécime	Estágio /Sexo	Hospedeiro	Localização	Identificação Morfológica	Identificação Genética
AV 32.1 AV 32.2 AV 32.3	F F F	<i>Stenella longirostris</i>	Caucaia, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I <i>Anisakis</i> sp. clado I <i>Anisakis</i> sp. clado I	ND ND ND
AV 33.1 AV 33.2 AV 33.3	F L F	<i>Steno bredanensis</i>	Aquiraz, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I <i>Anisakis</i> sp. clado I <i>Anisakis</i> sp. clado I	ND ND ND
AV34.3 AV 34.4	F M	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Icapuí, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I <i>Anisakis</i> sp. clado I	ND ND
AV 35.1 AV 35.4 AV 35.8	F F M	<i>Stenella longirostris</i>	Icapuí, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I <i>Anisakis</i> sp. clado I <i>Anisakis</i> sp. clado I	<i>A. typica</i> ND ND
AV 37.1 AV37.2 AV 37.3 AV 37.4	F M M F	<i>Stenella longirostris</i>	Camaçari, BA	<i>Pseudoterranova</i> sp <i>Pseudoterranova</i> sp <i>Pseudoterranova</i> sp <i>Pseudoterranova</i> sp	ND ND ND ND
AV 38.1	I	<i>Tursiops truncatus</i>	Ilhéus, BA	Indeterminado	<i>A. typica</i>
AV 39.1 AV 39.2 AV 39.4 AV 39.5	L L F F	<i>Kogia simus</i>	Barroquinha, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado II <i>Anisakis</i> sp. clado II <i>Anisakis</i> sp. clado II <i>Anisakis</i> sp. clado II	ND ND ND ND
AV 40.1 AV 40.3 AV 40.5	F F F	<i>Stenella clymene</i>	Itarema, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I <i>Anisakis</i> sp. clado I <i>Anisakis</i> sp. clado I	ND ND ND
AV 41	F	<i>Stenella frontalis</i>	Aracati, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I	<i>A. typica</i>
AV 42.1 AV 42.3 AV 42.5 AV 42.6 AV 42.7	L M F F F	<i>Stenella clymene</i>	Camaçari, BA	<i>Anisakis</i> sp. clado I <i>Anisakis</i> sp. clado I <i>Anisakis</i> sp. clado I <i>Anisakis</i> sp. clado I <i>Anisakis</i> sp. clado I	<i>A. typica</i> ND ND ND ND
AV 43.1 AV 43.2 AV 43.3 AV 43.4 AV 43.5 AV 43.6 AV 43.7 AV 43.8	F L L M F M F L	<i>Kogia breviceps</i>	Fortaleza, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado II <i>Anisakis</i> sp. clado II <i>Anisakis</i> sp. clado II <i>Anisakis paggiae</i> <i>Anisakis</i> sp. clado II <i>Anisakis paggiae</i> <i>Anisakis</i> sp. clado II <i>Anisakis</i> sp. clado II	ND ND ND ND ND ND ND ND
AV 44.1	I	<i>Peponcephala electra</i>	Caucaia, CE	Indeterminado	<i>A. typica</i>
AV 45.1	F	<i>Lagenodelphis hosei</i>	Beberibe, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I	<i>A. typica</i>
AV 46.1	F	<i>Stenella longirostris</i>	Icapuí, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I	<i>A. typica</i>
AV 47.1 AV 47.5	F L	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Icapuí, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I <i>Anisakis</i> sp. clado I	<i>A. typica</i> ND

Espécime	Estágio /Sexo	Hospedeiro	Localização	Identificação Morfológica	Identificação Genética
AV 48.1	L			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 48.2	L			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 49.1	I	<i>Stenella clymene</i>	C. Sauípe, BA	Indeterminado	<i>A.typica</i>
AV 51	I	<i>Stenella longirostris</i>	F.Noronha, PE	Indeterminado	<i>A.typica</i>
AV 52.1	F	<i>Stenella longirostris</i>	F.Noronha, PE	<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 52.5	M			<i>Anisakis</i> sp. clado I	ND
AV 53.1	I	<i>Stenella longirostris</i>	F.Noronha, PE	Indeterminado	<i>A.typica</i>
AV 54.1	I	<i>Stenella longirostris</i>		Indeterminado	<i>A.typica</i>
AV 55	I	<i>Stenella longirostris</i>	Fortaleza, CE	Indeterminado	<i>A.typica</i>
AV 56	L	<i>Mesoplodon europaeus</i>	Cruz, CE	<i>Anisakis</i> sp. clado I	<i>A. nascettii</i>
AV 57	I	<i>Stenella clymene</i>	Aracati, CE	Indeterminado	<i>A.typica</i>

6. DISCUSSÃO

6.1) Distribuição dos cetáceos, encalhe e o estudo da fauna parasitária.

O estudo da fauna parasitária de mamíferos marinhos depende do encalhe dos animais, da observação pública do episódio, da presença de uma instituição de monitoramento para recolhimento da carcassa, além de pessoal treinado para realizar a coleta e armazenamento das amostras biológicas de maneira que possam ser conduzidos diversos estudos posteriores. A Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos (AQUASIS), atuante no nordeste do Brasil, é a instituição que realizou tais procedimentos e forneceu as amostras deste trabalho como parte de um projeto colaborativo (Carvalho et al., 2010; Di Azevedo et al. 2011; Iniguez et al., 2011; Di Azevedo et al. 2012a; et al. 2012b).

Acredita-se que o encalhe de mamíferos marinhos em uma dada área reflita a circulação de animais vivos na região e a abundância de registros de encalhes na maioria dos casos seja proporcional à população viva na localidade (Maldini et al., 2005). Desta forma, os dados de encalhamento em uma região podem ser úteis como indicadores de composição de espécies no local quando outras fontes não são disponíveis (Sergeant, 1979). Entretanto, é preciso levar em consideração fatores como hábitos comportamentais da espécie, fatores oceanogeográficos e atividade antropogênica. Segundo dados da AQUASIS, as espécies com maiores registros de encalhe no nordeste do Brasil são *Sotalia guianensis*, *Physeter macrocephalus* e *Steno bredanensis*, enquanto *Lagenodelphis hosei*, *Pseudorca cassidens*, *Orcinus orca*, *Kogia sima* e *Mesoplodon europaeus* raramente são registrados (Meirelles et al., 2009). Mattiucci e colaboradores (2008) sugerem que distribuição geográfica dos nematódeos anisaquídeos sobreponha-se com aquela relatada para seus hospedeiros definitivos. O registro da distribuição dos parasitos desses animais fica então limitado aos locais da costa onde ocorreu o encalhe do mamífero e a abundância de determinada espécie em certa localidade depende da frequência de episódios de encalhe envolvendo seu hospedeiro.

Para melhor compreender a dinâmica de transmissão destes anisaquídeos no litoral brasileiro seria preciso pesquisar também sua ocorrência nos hospedeiros intermediários que constituem os itens alimentares dos cetáceos estudados. Vista a escassa pesquisa de anisaquídeos no Brasil e a crescente importância médica-veterinária, médica-humana e comercial, além da necessidade de contribuição para

o conhecimento da biodiversidade mundial, torna-se fundamental a continuação de estudos que visam à identificação integrada destes nematódeos no país.

6.1) Análise Morfológica

Os achados deste trabalho vão de acordo com esquema co-evolutivo proposto entre anisacídeos e cetáceos, onde espécies do clado I e II apresentam preferência por hospedeiros de famílias distintas (Mattiucci e Nascetti, 2006, 2008). Todas as espécies morfológicamente identificadas como pertencentes ao clado I eram parasitas de membros da família Delphinidae e Ziphiidae, enquanto que aquelas identificadas como do clado II estavam infectando indivíduos da família Kogiidae. O maior número de espécimes identificados como pertencentes ao clado I (n=60), comparado aos identificados como do clado II (n=24), pode ser explicado pelo n amostral de seus hospedeiros, que foi de 46 para a família Delphinidae e sete para a família Kogiidae (Tabela 4.1), o que é proporcional para a incidência de encalhe destes animais na costa do Nordeste. Segundo dados da AQUASIS, do ano de 1992 a 2005, encalharam apenas no Ceará, 213 indivíduos da família Delphinidae, enquanto que da família Kogiidae foram registrados apenas cinco episódios (Meirelles et al.,2009). Apesar da distribuição das baleias de espermacete (*K. sima* e *K. brevispiculata*) ser global e incluir a costa do nordeste brasileiro (Anexo 1), poucos são os registros de encalhe em todo o mundo (McAlpini, 2002). De acordo com Culik (2010), o comportamento das kogias ainda é pouco conhecido, mas sabe-se que preferem águas profundas e raramente são avistadas próximas à costa. O autor ainda associa a escassez de registros ao comportamento discreto desses animais.

6.1.1) Identificação morfológica de *Anisakis paggiae*

A chave taxonômica para reconhecimento de anisacídeos adultos é baseada na análise de alguns caracteres morfológicos principais: o tamanho e forma do ventrículo e dos espículos e o padrão de distribuição das papilas caudais. Neste trabalho, relatamos espécimes que pertencem ao clado II (Figura 5.2), de acordo com a descrição original de Mattiucci et al. (2005), “(...) ventrículo curto, nunca sigmoide e mais largo do que longo (...) espículos do macho são curtos, robustos

e de tamanho similar (...). As espécies descritas até o momento com estas características são: *A. physeteris*, *A. brevispiculata* e *A. paggiae*. Como podemos observar na Tabela 5.1, cinco espécimes machos (AV 14.6, AV 17.2, AV 26.2 e AV 43.6) apresentam espículos menores do que 0.35 mm e ventrículo menor do que 0.56 mm, o que exclui as espécies *A. physeteris* e *A. brevispiculata* (Figura 6.1). Além disso, os espécimes ainda apresentam espículos menores do que 0.22 mm e três placas caudais denticuladas (*denticulate caudal plates*-DCP) (Figura 5.6), com a mesma forma observada por Mattiucci et al. (2005), “(...) a primeira, próxima à cloaca, é maior; a do meio é curva; a última é quase semicircular (...)”. Desta forma, todos os caracteres morfológicos estão de acordo com a identificação taxonômica de *Anisakis paggiae* (Figura 6.1).

1. Spicules 0.35–0.40 mm.....	<i>A. physeteris</i>
– Spicules <0.35 mm.....	2.
2. Spicules 0.30–0.34 mm; length of ventriculus 0.56–0.60 mm.....	<i>A. brevispiculata</i>
– Spicules <0.30 mm; length of ventriculus <0.56 mm.....	3.
3. Spicules 0.17–0.22 mm; ventriculus 0.35–0.40 mm in length, violin-shaped; three thin denticulate caudal plates, width: wpl1: 0.049–0.051 mm; wpl2: 0.030–0.040; wpl3: 0.040–0.045...	<i>A. paggiae</i> n. sp.

Figura 6.1: Chave taxonômica original para identificação de *Anisakis* spp. do clado II descrita em Mattiucci et al.,2005.

Acredita-se que a esta espécie de anisquídeo tenha preferência por espécies de cetáceos da família Kogiidae, e os hospedeiros definitivos relatados até o momento incluem três espécies do gênero *Kogia*: *K. brevispiculata*, *K. breviceps* e *K. sima* (Mattiucci et al. 2005; Colón-Llavina et al.,2009; Cavallero et al. 2011). O achado neste estudo confirmou esta preferência de hospedeiros, já que os espécimes foram identificados em *K. breviceps*, o cachalote-pigmeu.

A distribuição geográfica de *A. paggiae* era restrita às águas boreais, em um espectro de 15⁰N a 45⁰N. Sua ocorrência já foi documentada da Costa da Flórida, Mar do Caribe, Costa Atlântica da Europa e litoral Pacífico do Japão (Mattiucci et al., 2005; Mattiucci et al., 2007; Colon-Llavina et al., 2009; Cavallero et al.2011; Murata et al., 2011). O presente estudo relata a ocorrência de *A. paggiae* em uma nova localização geográfica: o litoral Nordeste do Brasil, Costa Atlântica da América do Sul, revelando uma distribuição geográfica do parasita mais ampla, estendendo para 10⁰S e validando como sendo também uma espécie de ocorrência austral.

Tabela 6.1: Hospedeiros definitivos e intermediários de *A. paggiae* e localizações geográficas relatadas até o momento.

Hospedeiros	Localização geográfica	Referência
Definitivos:		
<i>Kogia breviceps</i> e <i>K. sima</i>	Costa da Flórida EUA	Mattiucci et al.,2005
<i>K. breviceps</i> e <i>K. sima</i>	Mar do Caribe	Colón-Llavina et al., 2009
<i>K. breviceps</i> e <i>K. sima</i>	Golfo do México	Cavallero et al., 2011
<i>K. breviceps</i>	Costa Atlântica do Brasil	Presente estudo
Intermediários:		
<i>Anoplogaster cornuta</i>	Mar Irminger (Atlântico Norte)	Klimpel et al., 2011
<i>Beryx splendens</i>	Costa Pacífica do Japão	Murata et al., 2011
<i>Merluccius merluccius</i>	Costa Atlântica do Europa	Mattiucci et al., 2007
<i>Xiphias gladius</i>	Costa Atlântica da Europa	Mattiucci et al., 2007

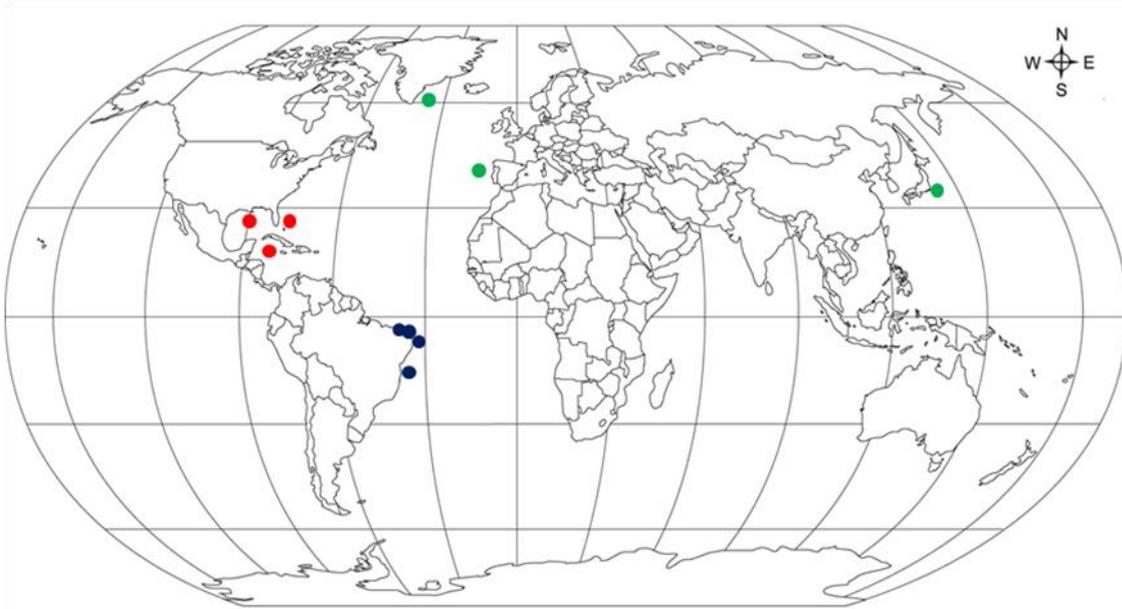


Figura 6.2: Localizações geográficas onde *A. paggiae* foi relatada até o momento. ● Hospedeiro definitivo, ● Hospedeiro intermediário, ● Hospedeiro definitivo do presente estudo.

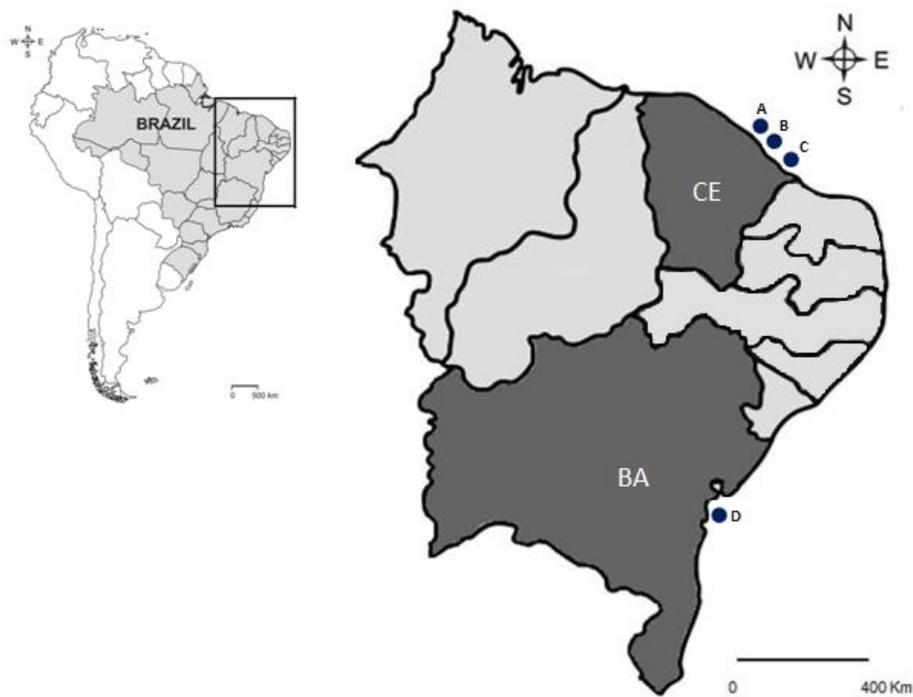


Figura 6.3: Locais de encalhe dos cetáceos onde *A. paggiae* foi identificado no presente estudo. **A-** *Kogia breviceps* (Fortaleza, CE); **B-** *K. breviceps* (Cascavél, CE); **C-** *K. breviceps* (Aracati, CE); **D-** *K. breviceps* (Valença, BA).

6.1.2) Identificação morfológica do gênero *Pseudoterranova*

A análise morfológica identificou os espécimes coletados do golfinho-rotator, *Stenella longirostris*, encalhado no litoral de Camaçari, Bahia, como pertencentes ao gênero *Pseudoterranova*. Apesar de este gênero apresentar preferência por membros da ordem Carnivora, subordem Pinnipedia (focas e leões marinhos), sua ocorrência já foi relatada em cetáceos (Abollo e Pascual, 2002.; Dollfus, 1966.; Gunter e Overstreet., 1974; Oporto e Torres, 1989; Sánchez et al., 2002; Torres et al., 1992) (Tabela 6.2). A variação nos parâmetros de infecção pode ser associada a fatores locais, como a disponibilidade de presas e alterações físicas no microambiente dos hospedeiros (Hudson et al., 2006.; Poulin, 2006).

No Brasil, o gênero já foi identificado em *Kogia breviceps* encalhada no litoral de Fernando de Noronha-PE (Santos e Lodi, 1998). Apesar dos *checklists* de Luque (2010) e Knoff (2012) indicarem *Balaenoptera borealis* e *B. physalus* como hospedeiros da espécie no Brasil, as referências associadas (Muniz-Pereira et al., 1999; Pinto et al., 2004.) não evidenciam a infecção destas baleias por *Pseudoterranova* sp., somente apenas pelo nematódeo *Crassicauda crassicauda*. Mais recentemente o gênero foi identificado infectando o golfinho riscado *Stenella coeruleoalba* na costa mediterrânea da Turquia (Aytemiz et al., 2012). A infecção por *Pseudoterranova* sp. em *Stenella longirostris* identificada neste estudo, constitui o primeiro relato deste gênero de anisquídeo nesta espécie de mamífero marinho.

Tabela 6.2: Hospedeiros cetáceos de *Pseudoterranova* sp. relatados até o momento.

Hospedeiros	Localização geográfica	Referência
<i>Kogia breviceps</i>	Costa oeste da França	Dollfus, 1966
<i>Kogia sima</i>	Golfo do México	Gunter and Overstreet, 1974
<i>Cephalorhynchus eutropia</i>	Litoral sul do Chile	Oporto e Torres, 1989; Torres et al.,1992
<i>Phocoena spinipinnis</i>		Torres et al.,1992.
<i>Tursiops truncatus</i>	Nordeste da Patagônia, Argentina.	Sánchez et al.,2002.
<i>Kogia breviceps</i>	Nordeste do Brasil	Santos e Lodi, 1998.
<i>Stenella coeruleoalba</i>	Costa Mediterrânea da Turquia	Aytemiz et al.,2012.
<i>Kogia breviceps</i>	Costa da Galícia, Noroeste da Espanha.	Abollo et al.,2002.
<i>Stenella longirostris</i>	Nordeste do Brasil	Presente estudo

6.2) Extração de DNA

Diferentemente de alguns vírus, bactérias e fungos, não é possível realizar procedimentos de cultura para reprodução e amplificação da quantidade de organismos, quando se trata de helmintos parasitos. Os espécimes, uma vez coletados, constituem uma amostra única, de quantidade finita. Torna-se então importante o acesso a estes organismos em acervos e coleções, e o trabalho com este tipo de material deve ser muito mais meticuloso. Com o propósito de preservação, essas amostras biológicas a princípio são inseridas em soluções à base de formalina, que acabam por limitar os estudos baseados no DNA. Schander e Halanych (2003) atentam para o fato de geralmente haver desconhecimento acerca das condições pelas quais o material foi submetido antes de chegar às mãos do grupo de estudo, como por exemplo, o tempo de fixação, o pH da solução e a temperatura de armazenamento, todos os fatores que influenciam na qualidade do DNA da amostra em questão (Koshiba et al.,1993; O'Lary et al.,1994). No caso das nossas amostras, com exceção de três que foram diretamente congeladas depois de coletadas, todas foram obtidas de instituições de estudo e pesquisa do nordeste que mantinham os anisquídeos em formalina, sendo as outras condições físico-químicas de armazenamento desconhecidas. Somente depois da análise morfológica no presente estudo que as amostras foram transferidas para a solução de etanol 70%, eficiente para remoção do formalina e menos danoso às moléculas da amostra (Rumph e Williams, 1986).

O efeito negativo da solução de preservação sobre o DNA foi observado pela comparação entre as concentrações de DNA obtidas nas amostras conservadas, cuja máxima foi 62 ng/ μ L, com aquelas obtidas nas amostras criopreservadas, que foram 117, 189 e 236 ng/ μ L (Tabela 5.4). Zimmermann e colaboradores (2008) avaliaram o efeito das soluções de preservação sobre a integridade do DNA e também caracterizaram sua fragmentação e limitada capacidade de amplificação. Ligações cruzadas com biomoléculas, como proteínas, é um fator bem conhecido para limitar a obtenção de altas concentrações de moléculas de ácido nucleicos (Feldman, 1973, Zeman et al.,1998).

Uma correlação entre tempo de preservação e concentração de DNA não foi observada, mas o método de extração escolhido, assim como o emprego ou não de

pré-tratamento, influenciou significativamente nas concentrações (Figura 5.7). O emprego da digestão com solução de CTAB mostrou uma eficácia significativa na extração com o kit QIAamp® DNA Investigator (Qiagen), possivelmente devido à sua eficiente capacidade em precipitar ácidos nucleicos. O CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromide*) é um poderoso detergente catiônico que apresenta a propriedade de precipitar ácidos nucleicos e eliminar polissacarídeos da solução (Sambrook e Russel, 2001) e sua aplicação vem sendo extensivamente relatado na literatura para extração de DNA a partir de materiais biológicos preservados em formalina (Yang et al.,1997; Valentini et al.,2006; Zhang, 2010; Jeon et al.,2011).

Desta maneira, recomendamos a extração pelo método de pre-digestão com solução de CTAB seguido da aplicação do kit comercial QIAamp® DNA Investigator (Qiagen) modificado neste estudo, para extração de DNA de helmintos preservados em formalina, AFA, ou álcool 70%, independentemente do tempo de fixação. Entretanto, é fortemente aconselhável a conservação de helmintos por criopreservação, sendo sempre superior a eficiência de recuperação e amplificação de DNA nestes espécimes, como demonstrado neste estudo. Carvalho e Vieira (2000) compararam diferentes métodos de preservação de espécimes biológicos, e posteriormente avaliaram eficiência da PCR e concluíram que conservar as amostras por congelamento aperfeiçoa consideravelmente a extração e amplificação do DNA.

6.3) Amplificação do DNA

Frence e Kocher (1996) notaram que amostras que haviam sido extensivamente manipuladas, apresentaram um perfil de amplificações inferior quando comparado às amostras não manipuladas. Os helmintos aqui trabalhados foram previamente estudados e analisados em microscópio óptico na tentativa de identificação morfológica. Atualmente, o procedimento recomendado é a separação das porções anteriores e posteriores para análise morfológica, já que os caracteres a serem observados e medidos seguindo as chaves taxonômicas encontram-se nestas regiões, e a criopreservação da porção mediana para a análise genética, possibilitando assim uma abordagem integrada.

Apesar da otimização da extração de DNA estabelecida neste estudo, a qual foi capaz de melhorar significativamente as concentrações de DNA (Tabela 5.2, Figura 5.7), a obtenção de fragmentos amplificáveis foi comprometida, como notado pelo número de espécimes não identificados geneticamente (Tabela 5.12). Sugere-se que as soluções de preservação afetam negativamente a eficiência da PCR, já que o DNA pode estar inibido e/ou degradado, por vezes de maneira irreversível (Srinivasan et al.,2002). Ligações cruzadas de moléculas das soluções com o ácido nucléico podem bloquear a ação da polimerase (Gilbert et al.,2007) e a exposição a esses conservantes acarreta em alto grau de fragmentação do DNA (Srinivasan et al.,2002). Como observado na Figura 5.9 e Tabela 4.2, todas as amostras com bandas fracas estavam preservadas em AFA (AV 35, AV 42, AV 45, AV 47 e AV 51), solução cuja composição inclui formalina. Enquanto que as amostras criopreservadas (AV 55, AV 56 e AV 57), apresentaram bandas de forte intensidade. O restante das amostras estava preservado em solução de Álcool 70%, que se acredita ser um conservante menos danoso ao DNA do que o formalina, mas existem relatos de que também ocasiona degradação/inibição do DNA (Carvalho et al.,2000; Dizdaroglu e Karakaya, 1997).

Devido à baixa qualidade/quantidade do DNA extraído dos espécimes deste estudo, qualquer contaminante, principalmente fungos, e bactérias que acompanham a amostra preservada, torna-se um forte competidor para amplificação enzimática. Como os parasitos deste estudo foram retirados de lesões gástricas das carcaças dos cetáceos, é possível que fungos tenham sido co-extraídos com os nematódeos (Iñiguez et al., 2011). Herniou (1998) e colaboradores enfatizam que parasitas entéricos estão rodeados de fontes contaminantes associadas aos hospedeiros, como a refeição mais recente e a microbiota do sistema digestivo. Neste estudo, quando foram aplicados os alvos genéticos das regiões ITS e gene 18S rDNA, foram comuns as ampliações/co-amplificações de fungos como, por exemplo *Malassezia* sp. Iñiguez et al. (2011) demonstrou a contaminação por *Aspergillus* sp. ao amplificar sequências de ITS e 18S rDNA deste fungo utilizando DNA extraído de nematoides conservados em formalina. Contaminações com amplicons previamente obtidos também podem ocorrer devido a uma proporção superior de DNA em relação a o das amostras fixadas. A análise morfológica prévia, assim como a natureza dos hospedeiros, são dados importantes para corroborar a identificação molecular das espécies. Uma alternativa traçada para contornar os

problemas de contaminação, e facilitar a amplificação do DNA, foi a utilização de primers espécie-específicos que produzem regiões menores. Os primers utilizados foram para região ITS de *A. typica* (Iñiguez et al., 2009) e novos foram desenhados neste estudo para a espécie *A. paggiae* com base na região ITS e o gene *cox2*. Estas duas espécies foram escolhidas para desenho dos primers, pois, a primeira é a mais prevalente na costa brasileira e no estudo, e a segunda, pela identificação morfológica determinada em alguns espécimes neste estudo. O emprego dessa abordagem, entretanto, não apresentou desempenho satisfatório, demonstrando q a degradação/fragmentação do DNA nestas amostras é intensa.

6.4) Análise Genética

A implementação das técnicas moleculares vem para complementar, e não substituir a taxonomia clássica, baseada na morfologia. O presente trabalho demonstrou que é possível aplicar ambas as abordagens, e fornecer uma identificação mais completa e concisa dos nematódeos anisaquídeos. A tendência atual é de incentivo ao fornecimento de informação genética para bancos internacionais e coleções biológicas, para o enriquecimento do conhecimento acerca da biodiversidade, principalmente pela iniciativa internacional do *Barcoding of Life*. Vista a dificuldade de obtenção de DNA a partir de amostras conservadas em formalina e outros preservantes, cresce então a necessidade de difusão de informação acerca da otimização do armazenamento de amostras. No caso dos anisaquídeos, deve-se incentivar a preservação em soluções apenas das porções anteriores e posteriores, e a criopreservação da região central do nematódeo. Assim, é possível fornecer uma identificação taxonômica tradicional com base na morfologia, que pode ser armazenada nas coleções biológicas, e uma identificação taxonômica molecular, a partir de um DNA íntegro, cuja sequência nucleotíca vem enriquecer os bancos de informação genética internacional.

6.4.1) Identificação genética de *Anisakis nascettii*

Este trabalho identificou, através de dois marcadores genéticos (*cox2* e ITS), a espécie *A. nascettii* coletada do estômago de um cetáceo encalhado na costa do Ceará. Os valores de distância genética interespecífica das sequências do gene *cox2* deste estudo e as oito espécies do gênero foram coerentes e muito próximos daqueles obtidos na primeira descrição da espécie (Mattiucci et al.,2009). A análise intraespecífica revelou baixos valores de distância genética, com um valor máximo de 0.024, enquanto que o valor mínimo de distância interespecífica foi de 0.10, com *A. ziphidarum*, a espécie mais proximamente relacionada.

A identificação da espécie como *A. nascettii* foi ainda reforçada pela análise da sequência da região ITS, que demonstrou uma similaridade de 99% com as demais sequências disponíveis para esta espécie. Em ambas as análises (ITS e *cox2*), a árvore NJ gerada apresentou os dois clados, com o espécime deste estudo incluído no clado I e agrupada no cluster de sequências *A. nascettii* suportado com altos valores de *bootstrap*. Esta é o primeiro depósito de sequência de ITS para esta espécie, sendo as anteriores (EU718477, AY260555) apenas sugeridas, ou corroboradas, já que foram geradas a partir de DNA extraído de larvas provenientes de hospedeiros intermediários, onde a identificação taxonômica da espécie não pode ser concluída.

A espécie *Anisakis nascettii* apresenta um comportamento especialista, parasitando preferencialmente espécies do gênero *Mesoplodon* (Mattiucci et al., 2009). Segundo Mead e colaboradores (1989), a exata distribuição das espécies deste gênero de cetáceo é conhecida quase exclusivamente pelos relatos de encalhe. Isso porque a identificação específica desses animais no mar é difícil e sua observação é relativamente rara. Baseado nesses relatos, a atual distribuição da baleia bicuda de Gervais ocorre principalmente no Oceano Atlântico Norte, incluindo o Golfo do México, o litoral leste dos Estados Unidos, a costa de Portugal, o litoral noroeste do continente Africano (Culik, 2004). Recentemente, a distribuição se expandiu após relatos de encalhamentos nos litorais sudeste (Santos et al.,2003) e nordeste (Martins et al.,2004) do Brasil (Anexo 1). Outras espécies do gênero que já foram relatadas como infectadas por *A. nascettii* são *M. grayi*, *layardi* e *M. densirostris* (Mattiucci et al.,2009; Iglesias et al.,2008), as quais apresentam uma

distribuição que abrange o litoral do Brasil (Pitman, 2002), o que tornaria possível a incidência da espécie *A. nascettii* na costa brasileira.

Os hospedeiros definitivos de *A. nascettii* relatados até o momento incluem as espécies *Mesoplodon grayi*, *M. bowdoini*, *M. layardi*, *M. mirus* e *M. densirostris*. Os três primeiros cetáceos foram encontrados encalhados na costa da Nova Zelândia (Mattiucci et al.,2009), e os últimos dois nos litorais da África do Sul (Mattiucci et al.,2009) e da Espanha (Iglesias et al.,2008), respectivamente. Localizações geográficas dos hospedeiros intermediários incluem a Costa da Madeira (Pontes et al.,2005), litoral da Europa (Mattiucci et al.,2007), Ilha Macquarie (Mattiucci et al.,2009) e costa do Japão (Murata et al.,2011) (Tabela 6.2, Figura 6.4).

O presente estudo demonstra pela primeira vez a ocorrência de *A. nascettii* na costa do Brasil, e em águas do Oceano Atlântico Oeste, revelando uma distribuição geográfica mais ampla desta espécie de parasita no mundo. Além disso, ampliou-se a gama de hospedeiros definitivos, apresentando uma nova espécie no ciclo de vida do nematódeo: *Mesoplodon europaeus*, a baleia-bicuda-de-Gervais. Este último achado também representa um dado inédito: a descrição de ocorrência de um parasita anisaquídeo neste gênero de cetáceo no Brasil.

Tabela 6.3: Hospedeiros e localização geográfica de *A. nascettii* relatados até o momento.

Hospedeiros	Localização Geográfica	Referência
Definitivos:		
<i>Mesoplodon bowdoini</i>	Oceano Pacífico SO (Nova Zelândia)	Mattiucci et al.2009
<i>Mesoplodon densirostris</i>	Oceano Atlântico NE (Espanha)	Iglesias et al.2008
<i>Mesoplodon grayi</i>	Oceano Pacífico SO (Nova Zelândia)	Mattiucci et al. 2009
<i>Mesoplodon layardii</i>	Oceano Pacífico SO (Nova Zelândia)	Mattiucci et al.2009
<i>Mesoplodon mirus</i>	Oceano Atlântico SE (África do Sul)	Mattiucci et al.2009
<i>Mesoplodon europaeus</i>	Oceano Atlântico Oeste (Brasil)	Presente estudo
Intermediários:		
<i>Aphanopus carbo</i>	Oceano Atlântico Central (Ilha da Madeira)	Pontes et al.2005
<i>Beryx splendens</i>	Oceano Pacífico NO (Japão)	Murata et al.2011
<i>Merluccius merluccius</i>	Oceano Atlântico NE (Costa da Europa)	Mattiucci et al.2007
<i>Moroteuthis ingens</i>	Oceano Pacífico Sul (Ilha Macquarie)	Mattiucci et al.2009
<i>Scomber japonicus</i>	Oceano Atlântico Central (Ilha da Madeira)	Pontes et al.2005

Legenda. SO: Sudoeste; S: Sudeste; NE: Nordeste; NO: Noroeste.

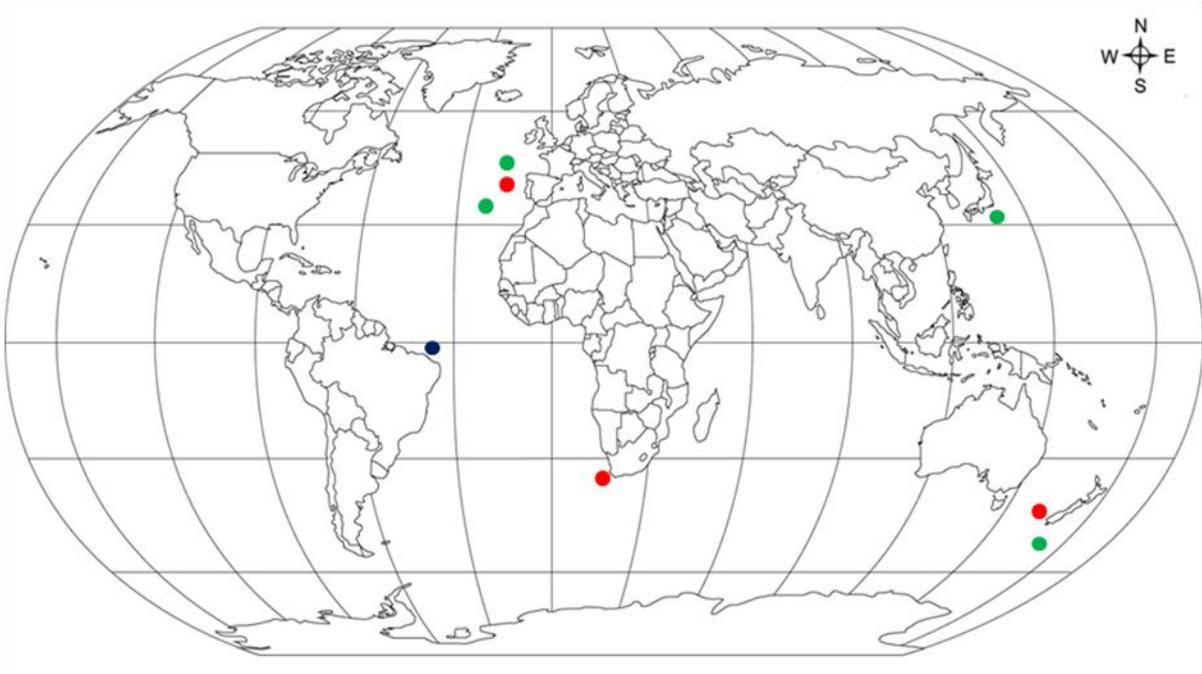


Figura 6.4. Localizações geográficas onde *A. nascettii* já foi relatado.

● Hospedeiro definitivo, ● Hospedeiro intermediário, ● Hospedeiro definitivo do presente estudo.

Nosso resultado é coerente com o tanglegrama co-evolutivo entre *Anisakis sp.* e hospedeiros cetáceos que vem sendo proposto por alguns autores (Mattiucci et al, 2006; Valentini et al, 2006; Iglesias et al, 2008; Mattiucci et al, 2008), onde *A. nascettii* parece apresentar uma preferência por espécies de hospedeiros do gênero *Mesoplodon*.

6.4.2) Identificação genética de *Anisakis typica*

Dentre as espécies do gênero *Anisakis*, *A. typica* é aquela mais amplamente distribuída (Figura 6.5). Tem sido relatada nos oceanos Atlântico, Pacífico, Índico e no Mar Mediterrâneo (Mattiucci e Nascetti, 2008). No Brasil, sua ocorrência já foi verificada no Rio de Janeiro e Ceará (Santos et al. 1996; Mattiucci et al. 2002; Iñiguez et al. 2009; et al., 2011; Borges et al. 2012) e apresenta-se como a espécie do gênero mais comumente identificada no litoral do país.

Como hospedeiros definitivos de *A. typica*, a maioria dos cetáceos relatados pertence à família Delphinidae, com exceção de *Phocoena phocoena* (Phocoenidae), *Pontoporia Blainvillei* (Pontoporidae) e *Kogia breviceps* (Kogiidae) (Tabela 6.3). Nossos resultados confirmam a preferência deste anisacídeo por membros da família Delphinidae, sendo que em três hospedeiros, *Stenella frontalis*, *Lagenodelphis hosei* e *Globicephala macrorhynchus*, o nematoídeo foi identificado pela primeira vez em águas do litoral brasileiro. No total, dezenove (n=19) espécimes, de onze localidades distintas dos estados do Ceará, Bahia e Pernambuco (Figura 6.6) foram identificados como *A. typica* com base nos marcadores *cox2*, ITS-1 e ITS-2, reafirmando a ampla ocorrência da espécie em águas tropicais.

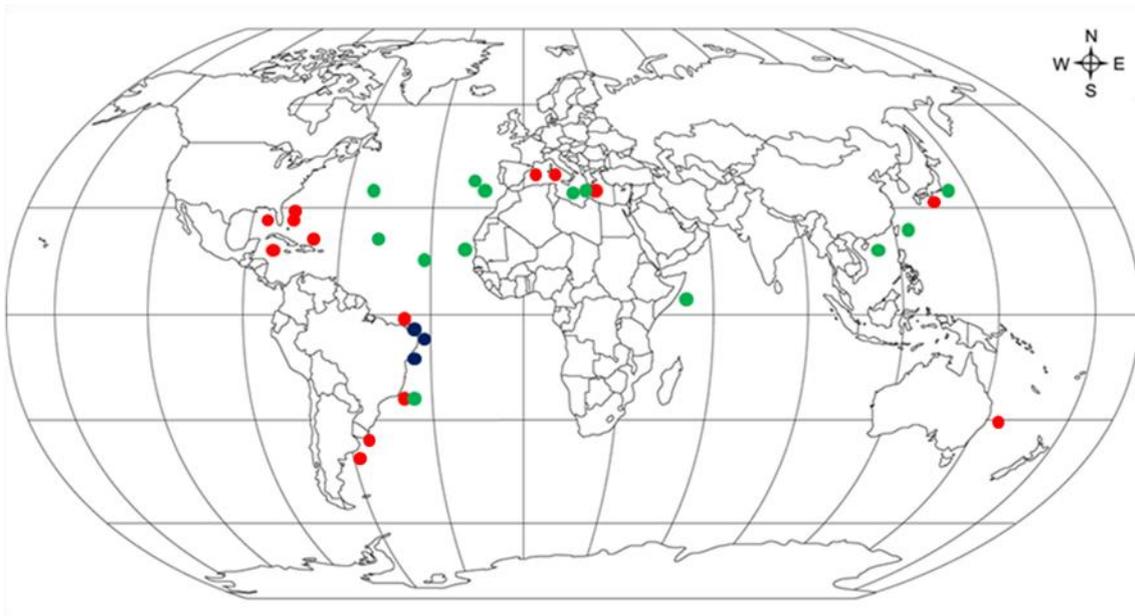


Figura 6.5. Localizações geográficas onde *A. typica* já foi relatada.

● Hospedeiro definitivo, ● Hospedeiro intermediário, ● Hospedeiro definitivo do presente estudo.

Tabela 6.4: Hospedeiros e localização geográfica de *A. typica* relatados até o momento. Hospedeiros onde *A. typica* foi identificado neste estudo estão representados por *.

Hospedeiros	Localização geográfica	Referencia
Definitivos:		
<i>Delphinus delphis</i>	Costa do Congo	Diesing, 1860; Davey, 1971.
<i>Feresa attenuata</i>	Costa da Florida	Conti e Frohlich, 1984.
<i>Globicephala maelena</i>	Mar Mediterrâneo	Dollfus, 1968; Shipley, 1905.
<i>Globicephala macrorhynchus</i> *	Mar do Caribe; Costa da Flórida.	Mignucci-Giannone et al., 1998; Cavallero et al., 2011
<i>Kogia breviceps</i>	Nordeste do Brasil	Iñiguez et al., 2011
<i>Lagenodelphis hosei</i> *	Golfo do México (Costa Flórida)	Cavallero et al. 2011.
<i>Lagenorhynchus obscurus</i>	Desconhecido	Baylis, 1929
<i>Peponocephala electra</i> *	Ilha Moreton (Austrália); Nordeste Brasil.	Cannon, 1977; Iñiguez et al. 2011
<i>Pontoporia blainvillei</i>	Costa do Japão; Costas do Uruguai e Argentina; Sudeste Brasil.	Kagei et al., 1976; Praderi, 1984; Aznar et al., 1995; Andreade et al., 1997
<i>Phocoena phocoena</i>	Oceano Pacífico Norte	Stiles e Hassall, 1899; Davey, 1971.
<i>Sotalia guianensis</i>	Nordeste Brasil	Iñiguez et al. 2009.
<i>Stenella attenuata</i>	Costa Flórida; Mar do Caribe.	Mattiucci et al. 2002.
<i>Stenella clymene</i> *	Costa Atlântica do Brasil (NE)	Iñiguez et al. 2011.
<i>Stenella coeruleoalba</i> *	Costa do Japão; Atlântico Nordeste; Mar mediterrâneo; Costa Carolina do Norte.	Kagei, 1967; Abril et al., 1986; Raga e Balbuena 1987; Cavallero et al. 2011.
<i>Stenella fluviatilis</i>	Costa Atlântica do Brasil (RJ)	Santos et al. 1996; Mattiucci et al. 2002.
<i>Stenella frontalis</i> *	Mar do Caribe	Mignucci-Giannone et al., 1998.
<i>Stenella longirostris</i> *	Brasil; Costa da Flórida.	D'amelio et al. 2000.
<i>Steno bredanensis</i> *	Mar do Caribe; Nordeste Brasil; Golfo do México.	Forrester & Robertson, 1975; Iñiguez et al. 2011; Cavallero et al. 2011.
<i>Tursiops truncatus</i> *	Mar Mediterrâneo, Costa Flórida, Mar do Caribe, Costa Porto Rico.	Dollfus, 1968; Raga e Balbuena, 1987; Cavallero et al. 2011, Colón-Llavina et 2009.

Continuação Tabela 6.4.

Hospedeiros	Localização geográfica	Referência
Intermediários:		
<i>Auxis tapeinosoma</i>	Mar Amarelo, China.	Du et al. 2010.
<i>Auxis thazard</i>	Costa Atlântica Brasil	Mattiucci et al.,2002; Iñiguez et al.,2009
<i>Beryx splendens</i>	Costa do Japão	Murata et al. 2011.
<i>Chelidonichthys kumu</i>	Mar Amarelo, China.	Du et al. 2010.
<i>Coryphaena hippurus</i>	Oceano Índico (Costa da Somália)	Mattiucci et al. 2002.
<i>Euthynnus affinis</i>	Oceano Índico (Costa da Somália)	Mattiucci et al. 2002.
<i>Merluccius merluccius</i>	Costa da Mauritània; Mar Mediterrâneo; Atlântico central leste.	Farjallah et al.,2008b, Mattiucci et al.,2002; Mattiucci e Nascetti, 2007
<i>Pagellus bogaraveo</i>	Ilha da Madeira	Hermida et al. 2012.
<i>Phycis phycis</i>	Mar Mediterrâneo	Farjallah et al. 2008a.
<i>Platichthys flesus</i>	Costa Atlântica Portugal	Marques et al. 2006.
<i>Nemipterus virgatus</i>	Mar da China	Zhu et al. 2007.
<i>Nemipterus bathybius</i>	Mar da China	Zhu et al. 2007.
<i>Sarda orientalis</i>	Oceano Índico (Costa da Somália)	Mattiucci et al. 2002.
<i>Selar crumenophthalmus</i>	Mar da China	Zhu et al. 2007.
<i>Scomber australasicus</i>	Mar da China (Costa de Taiwan)	Chou et al. 2011.
<i>Scomber japonicus</i>	Ilha da Madeira	Pontes et al. 2005.
<i>Scomber scombrus</i>	Mar Mediterrâneo	Farjallah et al. 2008a.
<i>Scomberomorus commerson</i>	Oceano Índico (Costa da Somália)	Mattiucci et al. 2002.
<i>Thunnus thynnus</i>	Costa Atlântica Brasil	Mattiucci e Nascetti, 2007.
<i>Trachurus picturatus</i>	Ilha da Madeira	Mattiucci et al.,2002; Pontes et al.,2005
<i>Trachurus trachurus</i>	Mar Mediterrâneo	Farjallah et al.,2008b; Mattiucci et al.,2008
<i>Trichiurus lepturus</i>	Costa Atlântica sudeste do Brasil	Borges et al. 2012.
<i>Trichiurus</i> spp.	Mar da China (Costa de Taiwan)	Umehara, 2010
<i>Xiphias gladius</i>	Oceano Atlântico Central	Mattiucci et al.,2007

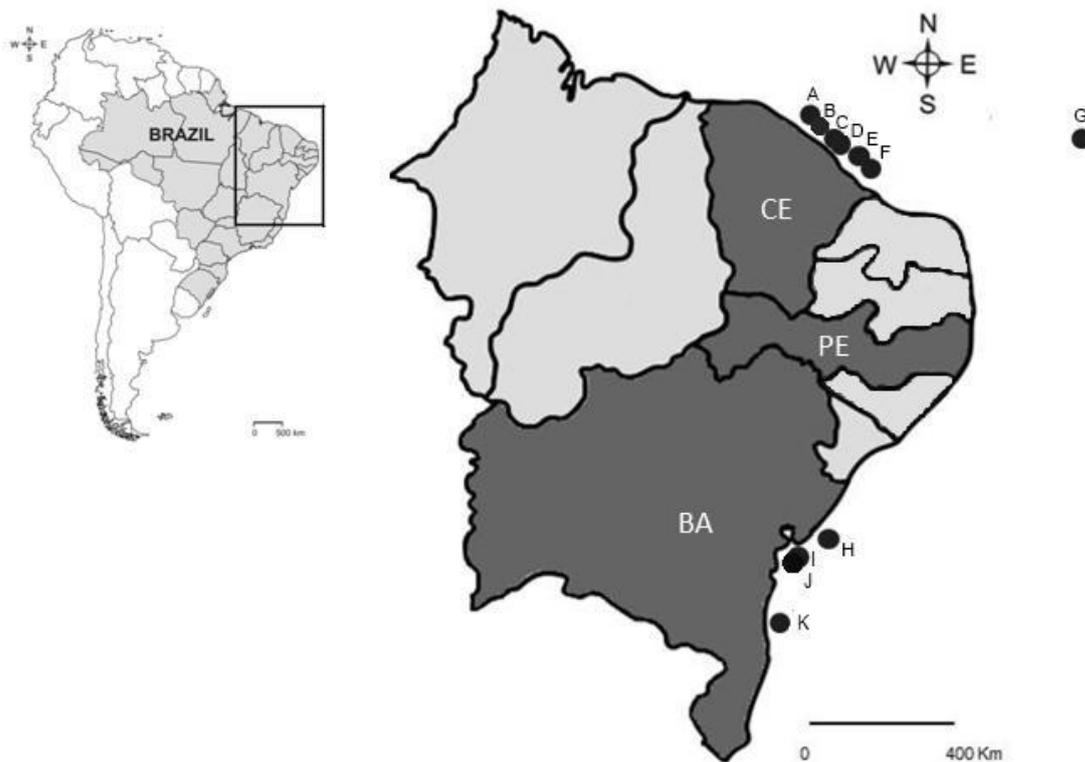


Figura 6.6. Locais de encalhe dos cetáceos onde *A. typica* foi identificado no Brasil. **A-** *S. longirostris* (Fortaleza, CE); **B-** *P. electra* (2) e *S. bredanensis* (Aquiraz, Ceará); **C-** *P. electra* (Caucaia, CE); **D-** *L. hosei* (Beberibe, CE); **E-** *S. frontalis*, *S. clymene* (Aracati, CE); **F-** *S. longirostris*, *S. longirostris*, *S. coeruleoalba* (Icapuí, CE); **G-** *S. longirostris* (3) e *G. macrorhynchus* (Fernando de Noronha, PE); **H-** *S. clymene* (Camaçari, BA); **I-** *S. bredanensis* (Vera Cruz, BA); **J-** *S. clymene* (Costa do Sauípe, BA); **K-** *T. truncatus* (Ilhéus, BA).

6.1) Avaliação do gene *cox2* como barcode de espécies do gênero *Anisakis*

O gene *cox2* mostra-se como um eficiente marcador para definição de espécies ou barcode do gênero *Anisakis*, sendo viável seu uso na taxonomia molecular, como pode ser observado na árvore filogenética gerada com as sequências obtidas neste estudo (Figura 5.9). Apesar da análise da região ITS gerar uma árvore com topologia semelhante, este marcador apresentou distâncias interespecíficas menores e não foi capaz de discriminar espécies muito próximas, como aquelas do complexo *A. simplex*. O gene 18S rDNA é capaz de aferir apenas à nível de gênero, mas de forma pouco confiável, visto que o gênero *Pseudoterranova* clusteriza junto com o gênero *Anisakis*. Não foi possível avaliar a eficiência do gene *cox1* como barcode, já que sequências de apenas 3 espécies (*A. simplex*, *A. physeteris* e *A. pegreffii*) estão disponíveis no banco internacional. A grande dificuldade de utilizar o gene *cox1*, barcode universal de animais, como barcode no gênero *Anisakis* consiste na falta de um banco de sequências representativo e curado com base em publicações científicas e material curado de coleções biológicas. Uma das condições estipuladas no macroprojeto internacional *Barcoding of Life* para a não utilização do marcador sugerido como barcode é precisamente a ausência de dados para a análise filogenética (www.barcodinglife.com).

As análises de sequências do gene *cox2* revelaram que a distância interespecífica de *A. nascettii* deste estudo e as outras espécies do gênero variou de 0.10 a 0.18 (DP 0.02), enquanto que a média da distância intraespecífica foi de 0.01 (DP 0). Já para *A. typica*, a média da distância intraespecífica foi de 0.02 (DP 0.01) e a interespecífica variou de 0.13 a 0.20 (DP 0.02). Não existe sobreposição entre as distâncias intra e interespecíficas, sendo que o maior valor da intra, não ultrapassa o menor valor da inter, apontando para a existência do chamado *barcoding gap* (Figura 5.12). Desta forma, o marcador é capaz de identificar os diferentes haplótipos desta espécie, e ao mesmo tempo discriminá-la das demais do mesmo gênero, sendo confiável seu uso como *barcode* do gênero *Anisakis*.

Valentini e colaboradores (2006) foram os primeiros a avaliarem a eficiência do marcador mitocondrial *cox2* para estimar divergência genética entre as espécies do gênero *Anisakis*. Obtiveram topologias semelhantes nas árvores geradas pelos

métodos de Máxima Parcimônia, distância-p e por Inferência Bayesiana, que por sua vez se mostraram congruentes com a topologia obtida pela análise de aloenzimas. Em todos os casos foi possível observar a formação de dois clados distintos e bem suportados. Posteriormente, Mattiucci e colaboradores descreveram novas espécies, *A. paggiae* (2005) e *A. nascettii* (2009) baseado na morfologia dos espécimens adultos e em análises filogenéticas inferidas por sequências do gene *cox2*. Casos de anisacariose humana também vêm sendo confirmados pela identificação genética do parasita baseado neste marcador (Mattiucci et al., 2007; Fumarola et al., 2009; Mattiucci et al., 2011)

O *GenBank* possui um número elevado de sequências (247) deste gene para o gênero (08/2012), e inclui todas as espécies descritas em trabalhos científicos publicados e validadas até o momento, o que possibilita uma identificação/diagnóstico confiável, rápido e preciso do espécimens em análise reforçando sua aplicabilidade como *barcode*.

7. CONCLUSÕES

- O estudo confirmou o paralelismo filogenético entre hospedeiros e anisaquídeos, onde espécies do clado I ocorrem principalmente em golfinhos (família Delphinidae) e baleia bicuda (família Ziphiidae), enquanto que espécies do clado II infectam preferencialmente baleias de espermacete (família Kogiidae).
- A preservação de material biológico em solução de conservação em formalina e álcool afetam negativamente a extração e amplificação do DNA, causando danos as vezes irreversível na molécula, impossibilitando a identificação molecular dos espécimes.
- Recomenda-se uma preservação diferenciada dos espécimes, de forma a permitir a identificação morfológica e molecular, com a criopreservação da parte mediana do espécime imediatamente após a coleta, e a preservação em solução conservante das porções anteriores e posteriores.
- O emprego do tampão CTAB na etapa de digestão e posterior aplicação do kit QIAamp® DNA Investigator (Qiagen) para extração de DNA de amostras preservadas em formalina, apresentou melhor desempenho, estatisticamente significativo, dentre os métodos testados, otimizando da extração de DNA..
- O método de Polimerização Reconstutora demonstrou eficiência na reconstrução do DNA degradado e obtenção de fragmentos amplificáveis após a PCR.
- O gene mtDNA *cox2* mostrou-se como o mais eficiente marcador para identificação de espécies ou *barcode* do gênero *Anisakis*, diferentemente dos marcadores ITS, 18S rDNA e *cox1*, que apresentaram diversas limitações.
- Identificou-se pela primeira vez a espécie *A. paggiae* em mamíferos marinhos do litoral brasileiro.
- Espécimes do gênero *Pseudoterranova* foram identificados pela primeira vez infectando o golfinho-rotator, *Stenella longirostris*.
- Identificou-se pela primeira vez a espécie *A. nascettii* em mamíferos marinhos do litoral brasileiro
- Um novo hospedeiro, *Mesoplodon europaeus*, foi relatado para a espécie *A. nascettii*.

- Confirmou-se a espécie *A. typica* como a mais prevalente no Brasil e no mundo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abollo, E., Gestal, C., Pascual, S., 2001. *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. *Parasitol Res* 87, 492-499.
- Abollo, E., Pascual, S., 2002. SEM study of *Anisakis brevispiculata* Dollfus, 1966 and *Pseudoterranova ceticola* (Deardorff and Overstreet, 1981) (Nematoda: Anisakidae), parasites of the pygmy sperm whale *Kogia breviceps*. *Scientia Marina* 66, 249-255.
- Adams, A.M., Murrell, K. D., and Cross, J. H., 1997. Parasites of fish and risks to public health. *Rev. Sci. Technol.* 16, 652-660.
- Alves, D.R., Luque, J.L., Paraguassú, A.R., 2002. Community ecology of the metazoan parasites of pink cusk-eel, *Genypterus brasiliensis* (Osteichthyes: Ophidiidae), from the coastal zone of the state of Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 683-689.
- Andreade, A., Pinedo, M.C., Pereira, J., Jr 1997. The gastrointestinal helminths of the Franciscana, *Pontoporia blainvillei*, in southern Brazil. *Annual Report of the International Whaling Commission* 47.
- Arduino, P., Nascetti, G., Cianchi, R., Plotz, J., Mattiucci, S., D'Amelio, S., Paggi, L., Orecchia, P., Bullini, L., 1995. Isozyme variation and taxonomic rank of *Contracaecum radiatum* (v. Linstow, 1907) from the Antarctic Ocean (Nematoda, Ascaridoidea). *Syst. Parasitol.* 30, 1-9.
- Arizono, N., Yamada, M., Tegoshi, T., Yoshikawa, M., 2012. *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii*: biological characteristics and pathogenetic potential in human anisakiasis. *Foodborne Pathog Dis* 9, 517-521.
- Asato, R., Wakuda, M., Sueyoshi, T., 1991. A case of human infection with *Anisakis physeteris* larvae in Okinawa, Japan. *J. Parasitol* 40, 181-183.
- Audicana, M.T., Kennedy, M.W., 2008. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin Microbiol Rev* 21, 360-379, table of contents.
- Aytemiz, I., Dede, A., Danyer, E., Tonay, A., 2012. Morphological identification of parasites found in the stomach contents of bycaught striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Turkish Eastern Mediterranean Sea coast. *J. Black Sea/Mediterranean Environment* 18, 238-245.

- Aznar, F.J., Raga, J.A., Corcuera, J., Monzon, F., 1995. Helminths as biological tags for franciscana (*Pontoporia blainvillei*) (Cetacea: Pontoporidae) in Argentinian and Uruguayan waters. *Mammalia* 59 427-435.
- Baylis, H.A., 1929. Parasitic Nematoda and Acanthocephala collected in 1925-27. *Discovery Reports* 1, 541-560.
- Beck, M., Evans, R., Feist, S.W., Stebbing, P., Longshaw, M., Harris, E., 2008, *Anisakis simplex* sensu lato associated with red vent syndrome in wild adult Atlantic salmon *Salmo salar* in England and Wales. *Dis Aquat Organ* 82, 61-65.
- Berland, B., 1961. Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia* 2, 1-50.
- Berrow, S., 2001. Biological diversity of cetaceans (whales, dolphins and porpoises) in Irish waters. In: Nunn, J.D. (Ed.) *Marine biodiversity in Ireland and adjacent waters*. Belfast: Ulster Museum, pp. 115-120.
- Blouin, M.S., 2002. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: Mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *Int J Parasitol* 32, 527-531.
- Bompar, J.M., 1996, Les échouages de cetacés. *Stenella* 10, 1-3.
- Borges, J.N., Cunha, L.F., Santos, H.L., Monteiro-Neto, C., Santos, C.P. 2012. Morphological and Molecular Diagnosis of Anisakid Nematode Larvae from Cutlassfish (*Trichiurus lepturus*) off the Coast of Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One* 7, e40447.
- Bullini, L., Nascetti, G., Paggi, L., Orecchia, P., Mattiucci, S., Berland, B., 1986, Genetic variation of ascaridoid worms with different life cycles. *Evolution* 40, 437-440.
- Cabrera, R., Ognio, L.S., 2002. Probable emergencia de anisakiosis por larvas de *Anisakis physeteris* durante el fenómeno El Niño 1997-98 en la costa peruana. *Parasitologia latinoamericana* 57, 166-170.
- Cannon, L.R.G., 1977. Some aspects of the biology of *Peponocephala electra* (Cetacea: Delphinidae). II. Parasites. *Aust J Mar Fres Research* 28, 717-722.
- Carvalho, A., Vieira, G. 2000. Comparison of preservation methods of *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae) for RAPD analysis. *An. Soc. Entomol. Bras* 29, 489-496

- Carvalho, V.L., Bevilaqua, C.M., Iniguez, A.M., Mathews-Cascon, H., Ribeiro, F.B., Pessoa, L.M., de Meirelles, A.C., Borges, J.C., Marigo, J., Soares, L., de Lima Silva, F.J., 2010. Metazoan parasites of cetaceans off the northeastern coast of Brazil. *Vet Parasitol* 173, 116-122.
- Casinos, A. Vericad, J.R. 1976. The cetaceans of the Spanish coasts: a survey. . *Mammalia* 40, 267-269.
- Cavallero, S., Nadler, S.A., Paggi, L., Barros, N.B., D'Amelio, S., 2011. Molecular characterization and phylogeny of anisakid nematodes from cetaceans from southeastern Atlantic coasts of USA, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Parasitol Res* 108, 781-792.
- Chai, J., Murrell, K., Lymbery, A. 2005. Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *Int J Parasitol* 35, 1233-1254.
- Chou, Y.Y., Wang, C.S., Chen, H.G., Chen, H.Y., Chen, S.N., Shih, H.H., 2011. Parasitism between *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) third-stage larvae and the spotted mackerel *Scomber australasicus* with regard to the application of stock identification. *Vet Parasitol* 177, 324-331.
- Clavel, A., Delgado, B., Acedo, C.S., Carbonell, E., Castillo, J., Ramírez, J., 1993. A live *Anisakis physeteris* larva found in the abdominal cavity of a woman in Zaragoza, Spain. *Jpn. J. Parasitol* 42:, 445-448.
- Colon-Llavina, M.M., Mignucci-Giannoni, A.A., Mattiucci, S., Paoletti, M., Nascetti, G., Williams, E.H., Jr., 2009. Additional records of metazoan parasites from Caribbean marine mammals, including genetically identified anisakid nematodes. *Parasitol Res* 105, 1239-1252.
- Conti, J.A., Frohlich, R.K., 1984. Gastrointestinal parasitism in pigmy killer whales. . *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*. 51, 364-365.
- Culik, B.M., *Odontocetes - the toothed whales. Distribution, Behaviour, Migration and Threats*. 2010. Maps by IUCN. Published by UNEP / CMS Secretariat, Bonn, Germany. http://www.cms.int/reports/small_cetaceans/index.htm.
- Dailey, M.D., 2001. *Parasitic Diseases*. CRC Press, Boca Raton, 767-778 pp.
- D'Amelio, S., Mathiopoulos, K.D., Santos, C.P., Pugachev, O.N., Webb, S.C., Picanco, M., Paggi, L., 2000. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int J Parasitol* 30, 223-226.
- Davey, J.T., 1971. A revision of the Genus *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridata). *Journal of Helminthology* 45, 51-72.

- Dhermain, F., Soulier, L., Bompar, J.M., 2002. Natural mortality factors affecting cetaceans in the Mediterranean Sea. Cetaceans of the Mediterranean and Black Seas: state of knowledge and conservation strategies. A report to the ACCOBAMS Secretariat, Monaco, Section 15, 14 p.
- Di Azevedo, MI, Carvalho, VL, Iñiguez, AM. 2011. Identificação de *Anisakis paggiae* na costa do Nordeste brasileiro. Anais do XII Congresso Brasileiro de Parasitologia, São Paulo-SP.
- Di Azevedo, MI, Carvalho, VL, Iñiguez, AM. 2012^a. *Barcoding de Anisakis* sp parasito de mamíferos marinhos: estabelecimento da distribuição de *Anisakis typica* na costa do Nordeste Brasileiro. Anais do XII Encontro Brasileiro de Patologistas Aquáticos, Bonito-MS.
- Di Azevedo, MI, Carvalho, VL, Iñiguez, AM. 2012^b "Identificação Genética de *Anisakis nascettii* (Nematoda:Anisakidae) na costa brasileira: dados adicionais de hospedeiro e localização geográfica do parasito. Anais do XII Encontro Brasileiro de Patologistas Aquáticos, Bonito-MS.
- Dias, F.J., São Clemente, S.C., Pinto, R.M., Knoff, M., 2010. Anisakidae nematodes and *Trypanorhyncha* cestodes of hygienic importance infecting the king mackerel *Scomberomorus cavalla* (Osteichthyes: Scombridae) in Brazil. Vet Parasitol 175, 351-355.
- Diesing, K.M., 1860. Revision der Nematoden. Akademie der Wissenschaften zu Wien, Sitzungsberichte, Mathematischnaturwissenschaftliche Klasse, 42, 595–763.
- Dizdaroglu, M. 1999. Mechanisms of Oxidative DNA damage; Lesions and Their Measurement. In Advances in DNA Damage and Repair: Oxygen Radical Effects, Cellular Protection and Biological Consequences. M. Dizdaroglu and A. E. Karakaya (eds). Plenum Publishing Corporation, 67-87.
- Dollfus, R., 1968. Nematodes des cetaces odontocetes (*Globicephalus* et *Tursiops*). Récoltes au large de la côte Méditerranéenne du Maroc par Herry Alonc. Bulletin de l'Institut des Pêches Maritimes du Maroc 16, 35-53.
- Dollfus, R.P., 1966. Helminthofaune de *Kogia breviceps* (Blainville 1838) cetacé odontocète. Annales de la Société des Sciences Naturelle. Charente-Maritime 4, 3-6.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19, 11-15.
- Dorris

- Du, C., Zhang, L., Shi, M., Ming, Z., Hu, M., Gasser, R.B., 2010. Elucidating the identity of *Anisakis* larvae from a broad range of marine fishes from the Yellow Sea, China, using a combined electrophoretic-sequencing approach. *Electrophoresis* 31, 654-658.
- Dunn, J.L., Buck, J.D., Robeck, T.R., 2001. Bacterial diseases of cetaceans and pinnipeds. Boca Raton, 1063 p.
- Engel, M.H., 1994. Encalhe de um cachalote, *Physeter macrocephalus*, provocado por um emalhamento em rede de pesca no litoral da Bahia, Brasil. Anais da VI Reunião de Trabalho de Especialistas em Mamíferos Aquáticos da América do Sul, Florianópolis, 99.
- Farjallah, S., Busi, M., Mahjoub, M.O., Slimane, B.B., Paggi, L., Said, K., D'Amelio, S., 2008a. Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes off the Moroccan and Mauritanian coasts. *Parasitol Int* 57, 430-436.
- Farjallah, S., Slimane, B.B., Busi, M., Paggi, L., Amor, N., Blel, H., Said, K., D'Amelio, S., 2008b. Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. from the North African coasts of Mediterranean Sea. *Parasitol Res* 102, 371-379.
- Feldman, M., 1973. Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 13, 1-49.
- Forrester, D.J., Robertson, W.D., 1975. Helminths of rough-toothed dolphin, *Steno bredanensis* Lesson 1828, from Florida Waters. *Journal of Parasitology* 61, 922.
- Fox, C.H., Johnson, F.B., Whiting, J., Roller, P.P. 1985. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem* 33, 845-853.
- France, S.C., Kocher, T.D., 1996. DNA sequencing of formalin-fixed crustaceans from archival research collections. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 5, 304-313.
- Friedman, Milton. 1940. A comparison of alternative tests of significance for the problem of *m* rankings. *The Annals of Mathematical Statistics* 11, 86–92.
- Fumarola, L., Monno, R., Ierardi, E., Rizzo, G., Giannelli, G., Lalle, M., Pozio, E. 2009. *Anisakis pegreffii* etiological agent of gastric infections in two Italian women. *Foodborne Pathog Dis* 6, 1157-1159.
- Gajewski, E., Dizdaroglu, M. 1990. Hydroxyl radical induced cross-linking of cytosine and tyrosine in nucleohistone. *Biochemistry.* 1990 Jan 30; 29, 977-980.

- Geraci, J., St Aubin, D., 1987. Effects of parasites on marine mammals. *Int J Parasitol* 17, 407-414.
- Gilbert, M.T., Binladen, J., Miller, W., Wiuf, C., Willerslev, E., Poinar, H., Carlson, J.E., Leebens-Mack, J.H., Schuster, S.C., 2007. Recharacterization of ancient DNA miscoding lesions: insights in the era of sequencing-by-synthesis. *Nucleic Acids Res* 35, 1-10.
- Golenberg, E.M., Bickel, A., Weihs, P., 1996. Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Research*, 24, 5026–5033.
- Gonzalez Quijada, S., Gonzalez Escudero, R., Arias Garcia, L., A.R., G.M., Vicente Serrano, J., Corral Fernandez, E., 2005. Anisakiasis gastrointestinal manifestations: description of 42 cases. *Rev. Clin. Esp.* 205, 311-315.
- Gunter, G., Overstreet., R., 1974. Cetacean notes. I. Sei and rorqual whales on the Mississippi coast, a correction. II. A dwarf sperm whale in Mississippi Sound and its helminth parasites. *Gulf Research Reports* 4, 479-481.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit:a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT. *Nucl. Acids Symp* 41, 95-98.
- Hauck, A.K., May, E.B., 1977. Histopathologic alterations associated with *Anisakis* larvae in Pacific herring from Oregon. *J Wildl Dis* 13, 290-293.
- Hebert, P.D., Cywinska, A, Ball, S and deWaard, J. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.* 270, 313–321.
- Hermida, M., Mota, R., Pacheco, C.C., Santos, C.L., Cruz, C., Saraiva, A., Tamagnini, P., 2012. Infection levels and diversity of anisakid nematodes in blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo*, from Portuguese waters. *Parasitol Res* 110, 1919-1928.
- Herniou, E.A., Pearce, A.C., Littlewood, D.T.J., 1998. Vintage helminths yield valuable molecules. *Parasitol. Today* 14, 289–292.
- Howard, E.B., Britt, J.O., Matsumoto, G., 1983. Parasitic diseases. Vol 1. CRC Press, Boca Raton.
- Hu, M., D'Amelio, S., Zhu, X., Paggi, L., Gasser, R., 2001. Mutation scanning for sequence variation in three mitochondrial DNA regions for members of the *Contraecaecum osculatum* (Nematoda: Ascaridoidea) complex. *Electrophoresis* 22, 1069-1075.
- Hudson, P.J., Dobson, A.P., Lafferty, K.D., 2006. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends Ecology Evolution* 21, 381-385.

- Iglesias, R., D'Amelio, S., Ingrosso, S., Farjallah, S., Martinez-Cedeira, J.A., Garcia-Estevez, J.M., 2008. Molecular and morphological evidence for the occurrence of *Anisakis* sp. A (Nematoda, Anisakidae) in the Blainville's beaked whale *Mesoplodon densirostris*. *J Helminthol* 82, 305-308.
- Iniguez, A.M., Carvalho, V.L., Motta, M.R., Pinheiro, D.C., Vicente, A.C., 2011. Genetic analysis of *Anisakis typica* (Nematoda: Anisakidae) from cetaceans of the northeast coast of Brazil: new data on its definitive hosts. *Vet Parasitol* 178, 293-299.
- Iniguez, A.M., Reinhard, K., Carvalho Goncalves, M.L., Ferreira, L.F., Araujo, A., Paulo Vicente, A.C., 2006. SL1 RNA gene recovery from *Enterobius vermicularis* ancient DNA in pre-Columbian human coprolites. *Int J Parasitol* 36, 1419-1425.
- Iniguez, A.M., Santos, C.P., Vicente, A.C., 2009. Genetic characterization of *Anisakis typica* and *Anisakis physeteris* from marine mammals and fish from the Atlantic Ocean off Brazil. *Vet Parasitol* 165, 350-356.
- Jefferson, T.A., Leatherwood, S., Webber, M.A., 1993. Marine mammals of the world: FAO species identification guide. Rome: FAO/UNEP, 320p p.
- Jensen, A.S., Silber, G.K., 2003. Large whale ship strike database. NOAA Technical Memorandum NMFSOPR, 37 pp.
- Jeon, H., Kim, K., Eom, K., 2011. Molecular identification of *Taenia* specimens after long-term preservation in formalin. *Parasitol Int.* 60, 203-205.
- Kagei, N., Tobayama, T., Nagasaki, Y., 1976, On the helminth of franciscana, *Pontoporia blainvillei*. . Science Report of The Whales Researches Institute 28, 161-166.
- Kannan, K., Tanabe, S., Borrell, A., Aguilar, A., Focardi, S., Tatsukawa, R., 1993. Isomer-specific analysis and toxic evaluation of polychlorinated bipenyls in striped dolphins affected by an epizootic in the Western Mediterranean sea. . Archives of Environmental Contamination and Toxicology 25, 227-233.
- Kennedy-Stoskopf, S., 2001. Viral diseases. Boca Raton: CRC Press, 1063p p.
- Kijewska, A., Dzido, J., Rokicki, J., 2009, Mitochondrial DNA of *Anisakis simplex* s.s. as a potential tool for differentiating populations. *J Parasitol* 95, 1364-1370.
- Kijewska, A., Rokicki, J., Sitko, J., Wegrzyn, G., 2002. Ascaridoidea: a simple DNA assay for identification of 11 species infecting marine and freshwater fish, mammals, and fish-eating birds. *Exp Parasitol* 101, 35-39.

- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. . J. Mol. Evol 16, 111-120.
- Klimpel, S., Kuhn, T., Busch, M.W., Karl, H., Palm, H.W., 2011, Deep-water life cycle of *Anisakis paggiae* (Nematoda: Anisakidae) in the Irminger Sea indicates kogiid whale distribution in north Atlantic waters. Polar Biol 34, 899-906.
- Klinowska, M., 1991. Cetacean live stranding dates relate to geomagnetic disturbances. Aquatic Mammals 11.
- Knoff, M., São Clemente, S.C., Gomes, D.C., Padovani, R.E.S., 2004. Primeira ocorrência de larvas de *Anisakis* sp. na musculatura de congro-rosa, *Genypterus brasiliensis* Regan, 1903. . R. bras. Ci. Vet. 11, 119-120.
- Koshiba, M., Ogawa, K., Hamazaki, S., Sugiyama, T., Ogawa, K., Hamazaki, S., Sugiyama, T., Ogawa, O., Kitajima, T., 1993. The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular-weight DNA from fixed and embedded tissues. . Pathol. Res. Practice 189, 66-72.
- Kuhn, T., Garcia-Marquez, J., Klimpel, S., 2011. Adaptive Radiation within Marine Anisakid Nematodes: A Zoogeographical Modeling of Cosmopolitan, Zoonotic Parasites. PLoS One 6, 1-6.
- Laist, D.W., Knowlton, A.R., Mead, J.G., Collet, A.S., Podesta, M., 2001. Collision between ships and whales. Marine Mammal Science. 17, 35-75.
- Li, A., D'Amelio, S., Paggi, L., He, F., Gasser, R.B., Lun, Z., Abollo, E., Turchetto, M., Zhu, X., 2005. Genetic evidence for the existence of sibling species within *Contracaecum rudolphii* (Hartwich, 1964) and the validity of *Contracaecum septentrionale* (Kreis, 1955) (Nematoda: Anisakidae). Parasitol. Res 96, 361-366.
- Luque, J.L., Muniz-Pereira, L.C., Siciliano, S., Siqueira, L.R., Oliveira, M.S., Vieira, F. M. 2010. Checklist of helminth parasites of cetaceans of Brazil. Zootaxa, 2548, 57-68.
- Luque, J.L., Cordeiro, A.S., Oliva, M.E., 2010. Metazoan parasites as biological tags for stock discrimination of whitemouth croaker *Micropogonias furnieri*. J Fish Biol 76, 591-600.

- Maldini, D., Mazzuca, L., Atkinson, S., 2005. Odontocete stranding patterns in the main Hawaiian Islands (1937–2002): how do they compare with live animal surveys? . *Pacific Science* 59, 55-67.
- Marques, J.F., Cabral, H.N., Busi, M., D'Amelio, S., 2006. Molecular identification of *Anisakis* species from Pleuronectiformes off the Portuguese coast. *J Helminthol* 80, 47-51.
- Martins, A.M.A., Alves-Junior, T.T., Furtado-Neto, M.A.A., Lien, J., 2004. The most northern record of Gervais' beaked whale, *Mesoplodon europaeus* (Gervais, 1855), for the southern hemisphere. *Latin American Journal of Aquatic Mammals* 3, 151-155.
- Mattiucci, S., Abaunza, P., Damiano, S., Garcia, A., Santos, M.N., Nascetti, G., 2007. Distribution of *Anisakis* larvae, identified by genetic markers, and their use for stock characterization of demersal and pelagic fish from European waters: an update. *J Helminthol* 81, 117-127.
- Mattiucci, S., Cianchi, R., Nascetti, G., Paggi, L., Sardella, N., Timi, J., Webb, S.C., Bastida, R., Rodriguez, D., Bullini, L., 2003. Genetic evidence for two sibling species within *Contracaecum ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941 (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of boreal and austral regions. *Syst Parasitol* 54, 13-23.
- Mattiucci, S., Farina, V., Campbell, N., Mackenzie, K., Ramos, P., Pinto, A.L., Abaunza, P., Nascetti, G., 2008a. *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: Their genetic identification and use as biological tags for host stock identification. *Fish. Res.* 89, 146-171.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., 2006. Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite* 13, 99-113.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., 2007. Genetic diversity and infection levels of anisakid nematodes parasitic in fish and marine mammals from Boreal and Austral hemispheres. *Vet Parasitol* 148, 43-57.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., 2007. Genetic diversity and infection levels of anisakid nematodes parasitic in fish and marine mammals from Boreal and Austral hemispheres. *Vet Parasitol* 148, 43-57.

- Mattiucci, S., Nascetti, G., 2008. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Adv Parasitol* 66, 47-148.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Bullini, L., Orecchia, P., Paggi, L., 1986. Genetic structure of *Anisakis physeteris*, and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae). *Parasitology* 93, 383-387.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Clanchi, R., Paggi, L., Arduino, P., Margolis, L., Bratney, J., Webb, S., D'Amelio, S., Orecchia, P., Bullini, L., 1997. Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex, with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *J Parasitol* 83, 401-416.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Dailey, M., Webb, S.C., Barros, N.B., Cianchi, R., Bullini, L., 2005. Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Syst Parasitol* 61, 157-171.
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Portes Santos, C., Costa, G., Di Benedetto, A.P., Ramos, R., Argyrou, M., Cianchi, R., Bullini, L., 2002. Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). *Syst Parasitol* 51, 159-170.
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Borrini, F., Palumbo, M., Palmieri, R., Gomes, V., Casati, A., Nascetti, G., 2011. First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. *BMC Infect Dis* 82, 1-6.
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Damiano, S., Nascetti, G., 2007. Molecular detection of sibling species in anisakid nematodes. *Parassitologia* 49, 147-153.
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Olivero-Verbel, J., Baldiris, R., Arroyo-Salgado, B., Garbin, L., Navone, G., Nascetti, G., 2008b. *Contracecum bioccai* n. sp. from the brown pelican *Pelecanus occidentalis* (L.) in Colombia (Nematoda: Anisakidae): morphology, molecular evidence and its genetic relationship with congeners from fish-eating birds. *Syst Parasitol* 69, 101-121.
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Webb, S.C., 2009. *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological

- description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Syst Parasitol* 74, 199-217.
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Webb, S.C., Sardella, N., Timi, J.T., Berland, B., Nascetti, G., 2008. Genetic relationships among species of *Contraecaecum* Railliet & Henry, 1912 and *Phocascaris* Host, 1932 (Nematoda: Anisakidae) from pinnipeds inferred from mitochondrial cox2 sequences, and congruence with allozyme data. *Parasite* 15, 408-419.
- Meirelles, A.C.M.-N., C. ; Martins, A. M. A. ; Costa, A. F. ; Barros, H ; Alves, D. , 2009. Cetacean strandings on the coast of Ceará northeastern Brazil (1992–2005). *J Mar Biol Ass Unit King* 89, 1-8.
- Meirelles, A.C.O., Barros, H.M.R., 2007. Plastic debris ingested by a rough-toothed dolphin, *Steno bredanensis*, stranded alive in northeastern Brazil. *Biotemas* 20, 127- 131.
- Mignucci-Giannone, A.A., Hoberg, H.P., Siegel-Causey, D., Williams, E.H.J., 1998. Metazoan parasites and other symbionts of cetaceans in the Caribbean. *Journal of Parasitology* 84, 939-946.
- Mignucci-Giannoni, A., Pinto-Rodriguez, B., Velasco-Escudeiro, M., Montoya-Ospina, R.A., Jimenez-Marrero, N.M., Rodriguez-Lopez, M.A., Williams, E.H.J., Odell, D.K., 1999. Cetacean strandings in Puerto Rico and the Virgin Islands. *Journal of Cetacean Research and Management* 1, 191-198.
- Miller, S.E., 2007. DNA barcoding and the Renaissance of taxonomy. . *Proceedings of the Natural Academy of Science of USA* 104, 4775-4776.
- Muniz-Pereira, L.C., Vicente, J.J., Noronha, D., 1999. Helminths parasites of whales in Brazil. *Rev Bras Zoo* 16, 249-252.
- Murata, R., Suzuki, J., Sadamasu, K., Kai, A., 2011. Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Beryx splendens* from Japanese waters. *Parasitol Int* 60, 193-198.
- Nadler, S.A., D'Amelio, S., Dailey, M.D., Paggi, L., Siu, S., Sakanari, J.A., 2005. Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contraecaecum* from northern Pacific marine mammals. *J Parasitol* 91, 1413-1429.
- Nadler, S.A., D'Amelio, S., Fagerholm, H.P., Berland, B., Paggi, L., 2000. Phylogenetic relationships among species of *Contraecaecum* Railliet & Henry,

- 1912 and *Phocasaris* Host, 1932 (Nematoda:Ascaridoidea) based on nuclear rDNA sequence data. *Parasitology* 121 (Pt 4), 455-463.
- Nascetti, G., Paggi, L., Orecchia, P., Smith, J.W., Mattiucci, S., Bullini, L., 1986. Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida:Anisakidae) from the Mediterranean and North-East Atlantic. *Int J Parasitol* 16, 633-640.
- Nicholas KB, Nicholas HB. 1997. GeneDoc, a tool for editing and annotating multiply sequence alignments. Distributed by the author. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- Noguera, P., Bruno, D., Pert, C., Webb, J., 2008. Red vent syndrome (RVS) in wild Atlantic salmon: an update on research and monitoring in Scotland. *Atl Salmon Trust J Summer*, 25-27.
- Noguera, P., Collins, C., Bruno, D., Pert, C., Turnbull, A., McIntosh, A., Lester, K., Bricknell, I., Wallace, S., Cook, P., 2009. Red vent syndrome in wild Atlantic salmon *Salmo salar* in Scotland is associated with *Anisakis simplex* sensu stricto (Nematoda: Anisakidae). *Dis Aquat Organ* 87, 199-215.
- Nores, C., Perez, C., 1988, Multiple strandings of *Stenella coeruleoalba* and *Globicephala macrorhynchus* on the coast of Spain. *European Research on Cetaceans* 2, 25-26.
- Norman, S.A., Bowlby C.E., Brancato M.S., Calambokidis J., Duffield, D., G.P.J., Gornall T.A., Goshio M.E., Hanson B., Jefries S.J., Lagerquist B., Lambourn D.M., Mate B., Norberg B., Osborne R.W., Rash J.A., S., R., J., S., 2004. Cetacean strandings in Oregon and Washington between 1930 and 2002. *Journal of Cetacean Research and Management* 6, 87-99.
- Olson, A.C., Lewis, M.D., Hauser, M.L., 1983. Proper identification of Anisakine worms. *American J. of Medical Technology*. 49, 111-114.
- Oporto, J., Torres, P., 1989. First record of *Pseudoterranova* (Nematoda: Anisakidae) from the Chilean dolphin, *Cephalorhynchus eutropia* (Cetacea: Delphinidae). *Bol Chil Parasitol* 44, 92-93.
- Orecchia, P., Paggi, L., Mattiucci, S., Nascetti, G., Smith, J.W., Bullini, L., 1986. Electrophoretic identification of larvae and adults of *Anisakis* (Ascaridida: Anisakidae). *J. Helminthol* 60, 331-339.
- Oshima, T., 1987. Anisakiasis is the Sushi bar guilty? *Parasitol. Today* 3, 44-48.

- Padovani, R.E.S., Knoff, M., São Clemente, S.C., Mesquita, E.F.M., Jesus, E.F.O., C., G.D., 2005. The effect of in vitro gamma radiation on *Anisakis* sp. Larvae collected from the pink cuskeel, *Genypterus brasiliensis* Regan, 1903. . Rev. bras. Ci. Vet. 12, 137-141.
- Paggi, L., Mattiucci, S., D'Amelio, S., 2001. Allozyme and PCR-RFLP markers in anisakid nematodes, ethiological agents of human anisakidosis. Parassitologia 43 Suppl 1, 21-27.
- Pellegrini, M., Occhini, R., Tordini, G., Vindigni, C., Russo, S., Marzocca, G., 2005. Acute abdomen due to small bowel anisakiasis. Dig. Liver Dis. 37, 65-67.
- Perrin, W.F., Geraci, J.R., 2002. Stranding. Academic Press, San Diego, 1414p.
- Pinel, C., Beaudevin, M., Chermette, R., Grillot, R., Ambroise-Thomas, P., 1996. Gastric anisakidosis due to *Pseudoterranova decipiens* larva. The Lancet 347, 1829.
- Pinto, R.M., Muniz-Pereira, L.C., Alves, V.C., Siciliano, S., 2004. First report of a helminth infection for Bryde's whale, *Balaenoptera edeni* Anderson, 1878 (Cetacea, Balaenopteridae). Latin American Journal of Aquatic Mammals 3, 167-170.
- Pitman, R., 2002. Mesoplodont whales. , In: Perrin WF, W.B., Thewissen JGM (Ed.) Encyclopedic of marine mammals. Academic Press, San Diego, pp. 738-742.
- Pontes, T., D'Amelio, S., Costa, G., Paggi, L., 2005. Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of Madeira by a PCR-based approach, with evidence for a new species. J Parasitol 91, 1430-1434.
- Poulin, R., 2006. Variation in infection parameters among populations within parasite species: intrinsic properties versus local factors. International J Parasitol 36., 877-885.
- Praderi, R., 1984. Mortalidad de franciscana, *Pontoporia blainvillei*, en pesquerías artesanales de tiburón de la costa Atlántica Uruguaya. . Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales 'Bernardino Rivadavia' e Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales 13, 259-272.
- Quach, N., Goodman, M.F., Shibata, D., 2004. In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR. BMC Clinical Path. 4, 1-8.
- Raga, J.A., Balbuena, J.A., 1987. Algunas características zoogeográficas de los helmintos de los cetáceos en el Mediterráneo, con especial referencia a la

- helminthofauna del delfin listado. In: Sans-Coma, V., Mas-Coma, S. & Gsalbez, J. (Eds) Mamíferos y helminthos. Barcelona: Ketres Editores, pp. 195–201.
- Read, A.J., Drinker, P., Northridge, S. 2003. By-catches of marine mammals in US fisheries and a first attempt to estimate the magnitude of global marine mammal by-catch. In: International Whaling Commission (Cambridge, UK, Scientific Committee Document SC/55/BC5.).
- Reidarson, T.H., Mc Bain, J.F., Dalton, L.M., Rinaldi, M.G., 2001. Mycotic diseases. In Dierauf, L.A; Gulland, F.M.D (eds). Handbook of marine mammal medicine 1063p. Boca Raton: CRC Press, p.337-355.
- Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Krawetz S MS, editor. Totowa, NJ: Humana Press p 365-386.
- Rumph PF, Williams JC. 1986. A comparison of the efficiency of water and ethanol at removing formaldehyde from immersion fixed muscle tissues. Anat Histol Embryol 15, 269-76.
- Sambrook, Russell, 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, J., Kuba, L., Berón-Vera, B., L. Dans, S., Crespo, E., Van Bresseem, M., Coscarella, M., García, N., KoenAlonso, M., Pedraza, S., Mariotti, P., 2002. Uterine adenocarcinoma with generalised metastasis in abottlenose dolphin *Tursiops truncatus* from northern Patagonia, Argentina. Dis Aquat Organ 48, 155-159.
- Santos, C.P., Lodi, L., 1998, Occurrence of *Anisakis physeteris* Baylis, 1923 and *Pseudoterranova* sp. (Nematoda) in pygmy sperm whale *Kogia breviceps* (De Blainvillei, 1838) (Physeteridae) in northeastern coast of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 93, 187-188.
- Santos, C.P., Rohde, K., Ramos, R., Di Benedetto, A.P., Capistrano, L., 1996. Helminths of cetaceans on the southeastern coast of Brazil. Journal of the Helminthological Society of Washington 63, 149-152.
- Santos, M.C., Zampirolli, E., Castro, A.F., Alvarenga, F.S., 2003. A Gervais' beaked whale (*Mesoplodon europaeus*) washed ashore in southeastern Brazil: extra limital record? Aquatic Mammals 29, 404-410.

- Schander, C., Halanych, K.M., 2003. DNA, PCR and formalized animal tissue - a short review and protocols. *Organisms, Diversity & Evolution* 3, 195-203.
- Sergeant, D.E., 1979, Ecological aspects of cetacean strandings. Marine Mammal Commission Springfield, VA.
- Shamsi, S., Butcher, A., 2011. First report of human anisakidosis in Australia. *Med J Aust.* 194, 199-200.
- Shiple, A.E., 1905. Notes on a collection of parasites belonging to the Museum of the University College, Dundee. *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society. Biological Sciences.* 13, 95-102.
- Srinivasan, M., Sedmack, D., Jewell., S., 2002. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am. J. Pathol.* 161, 1961-1971.
- Stiles, C.H., Hassall, A., 1899. Internal parasites of the fur seal. In: *The fur seals and fur seal islands of the North Pacific Ocean.* Washington: Government Printing Office, Part III, pp. 99–107.
- Szostakowska, B., Myjak, P., Kur, J., 2002. Identification of anisakid nematodes from the Southern Baltic Sea using PCR-based methods. *Molecular and Cellular Probes* 16, 111-118.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731 - 2739.
- Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T., 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.
- Torres, P., Oporto, J.A., Brieva, L.M., Escare, L., 1992. Gastrointestinal helminths of the cetaceans *Phocoena spinipinnis* (Burmeister, 1865) and *Cephalorhynchus eutropia* (Gray, 1846) from the southern coast of Chile. *J Wildl Dis* 28, 313-315.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Uchida, A., 2007. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitology International* 56, 211-215.

- Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Uchida, A., Sugiyama, H., 2008, Molecular Analysis of Japanese *Anisakis simplex* worms. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health* 39, 26-31.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Ooi, H.K., Uchida, A., Ohmae, H., Sugiyama, H., 2010. Molecular identification of *Anisakis* type I larvae isolated from hairtail fish off the coasts of Taiwan and Japan. *Int J Food Microbiol* 143, 161-165.
- Valentini, A., Mattiucci, S., Bondanelli, P., Webb, S.C., Mignucci-Giannone, A.A., Colom-Llavina, M.M., Nascetti, G., 2006. Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial *cox2* sequences, and comparison with allozyme data. *J Parasitol* 92, 156-166.
- Vidal-Martinez, V.M., Osorio-Saraiba, D., Overstreet, R.M., 1994. Experimental infection of *Contracaecum multipapillatum* (Nematoda: Anisakinae) from Mexico in the domestic cat. *J. Parasitol.* 80, 576-579.
- Wilcoxon, Frank. 1945. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bulletin* 1, 80–83.
- Williams, C., Ponten, F., Moberg, C., Soderkvist, P., Uhlen, M., Ponten, J., Sitbon, G., Lundeberg, J., 1999. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 155, 1467-1471.
- Yang, H., Edward, M., Golenbergand, Shoshani, J., 1997. Proboscidean DNA from Museum and Fossil Specimens: An Assessment of Ancient DNA Extraction and Amplification Techniques. *Biochemical Genetics* 35, 165-179.
- Zeman, S.M., Philipps, D.R., Crothers, D.M., 1998. Characterization of covalent Adriamycin-DNA adducts. *Proc. Natl. Acad. Sci* 95, 11561–11565.
- Zhang, J., 2010. Exploiting formalin-preserved fish specimens for resources of DNA barcoding. *Mol Ecol Resour* 10, 935-941.
- Zhu, X., D'Amelio, S., Hu, M., Paggi, L., Gasser, R.B., 2001. Electrophoretic detection of population variation within *Contracaecum ogmorhini* (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). *Electrophoresis* 22, 1930-1934.
- Zhu, X., Gasser, R.B., Podolska, M., Chilton, N.B., 1998. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol* 28, 1911-1921.
- Zhu, X.Q., D'Amelio, S., Paggi, L., Gasser, R.B., 2000. Assessing sequence variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA within and among

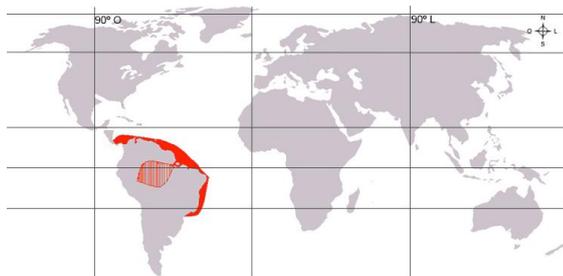
- members of the *Contraecaecum osculatum* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). Parasitol. Res. 86, 677-683.
- Zhu, X.Q., D'Amelio, S., Palm, H.W., Paggi, L., George-Nascimento, M., Gasser, R.B., 2002. SSCP-based identification of members within the *Pseudoterranova decipiens* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) using genetic markers in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Parasitology 124, 615-623.
- Zhu, X.Q., Gasser, R.B., Jacobs, D.E., Hung, G.C., Chilton, N.B., 2000b. Relationships among some ascaridoid nematodes based on ribosomal DNA sequence data. Parasitol. Res. 86, 738-744.
- Zhu, X.Q., Podolska, M., Liu, J.S., Yu, H.Q., Chen, H.H., Lin, Z.X., Luo, C.B., Song, H.Q., Lin, R.Q., 2007. Identification of anisakid nematodes with zoonotic potential from Europe and China by single-strand conformation polymorphism analysis of nuclear ribosomal DNA. Parasitol Res 101, 1703-1707.
- Zimmermann, J, Hajibabaei M, Blackburn DC, Hanken J, Cantin E, Evans TC. 2008. DNA damage in preserved specimens and tissue samples: a molecular assessment. Entomology 5, 18.
- Zvejnieks, P., Lichtenstein, K., Koneman, E., 1998. Luminal anisakidosis due to *Pseudoterranova decipiens*. Clin Infect Dis. 26, 1222-1223.

ANEXO 1

Distribuição geográfica dos mamíferos marinhos incluídos neste estudo.

Família Delphinidae:

Sotalia guianensis



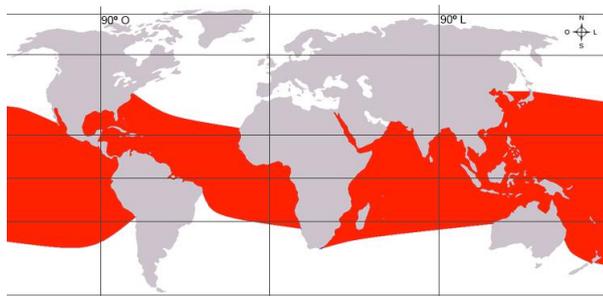
Águas superficiais da costa e rios do nordeste da América do Sul e costa leste da América Central (mod. de Flores, 2002; © CMS/GROMS)

Stenella frontalis



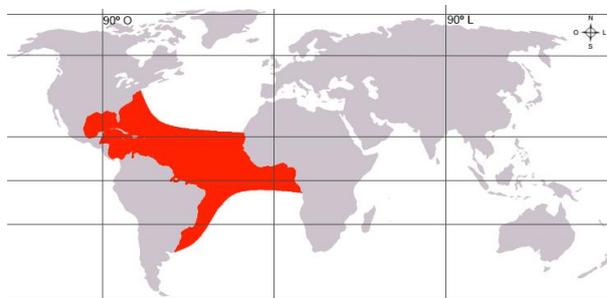
Águas temperadas, tropicais e subtropicais do Atlântico Norte e Sul (mod. de Perrin et al, 2002, © CMS/GROMS).

Stenella longirostris



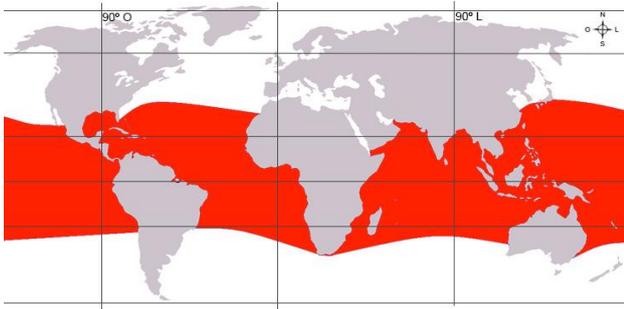
Águas temperadas, tropicais e subtropicais em todo o mundo (mod. de Perrin, 2002 © CMS/GROMS).

Stenella clymene



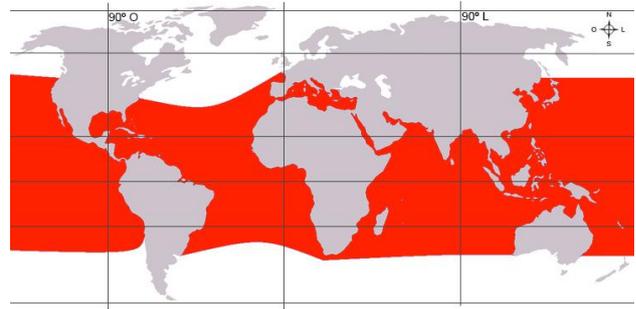
Águas tropicais e subtropicais do oceano Atlântico Norte e Atlântico Sul (mod. de Fertl et al. 2003; © CMS/GROMS).

Peponocephala electra



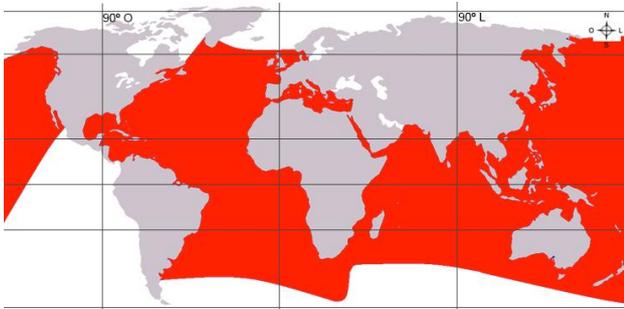
Águas temperadas, tropicais e subtropicais em todo o mundo (mod. de Perryman, 2002 © CMS/GROMS).

Steno bredanensis



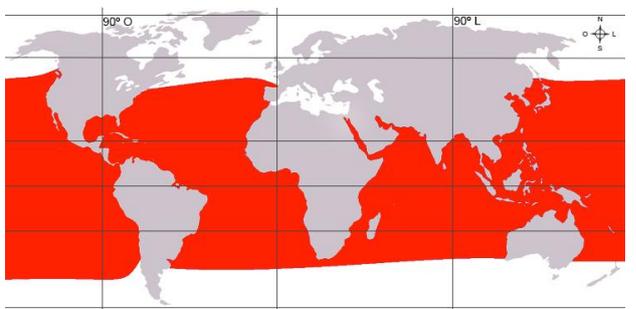
Águas temperadas, tropicais e subtropicais em todo o mundo (mod. de Jefferson, 2002, © CMS/GROMS).

Stenella coeruleoalba



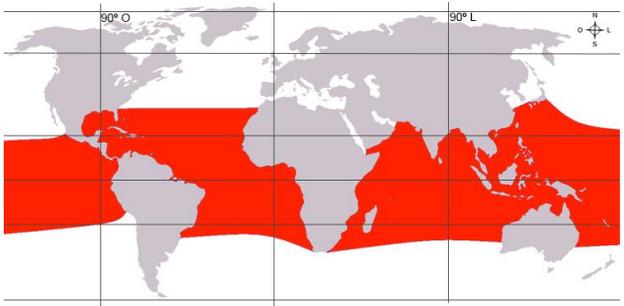
Águas temperadas, tropicais e subtropicais em todo o mundo (mod. de Archer 2002, © CMS/GROMS):

Globicephala macrorhynchus



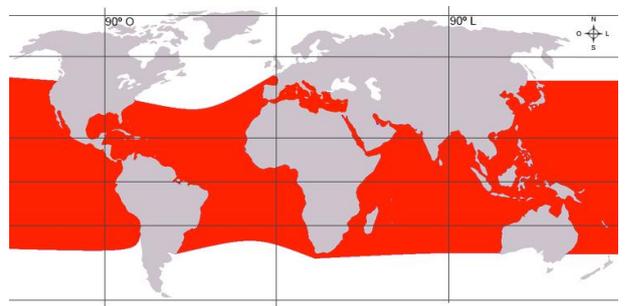
Águas temperadas, tropicais e subtropicais em todo o mundo (mod. de Olson and Reilly, 2002; © CMS/GROMS)

Lagenodelphis hosei



Águas temperadas, tropicais e subtropicais em todo o mundo (mod. de Dolar, 2002, © CMS/GROMS).

Tursiops truncatus



Águas temperadas, tropicais e subtropicais em todo o mundo (mod. de Wells e Scott, 2002; © CMS/GROMS)

Família Ziphiidae:

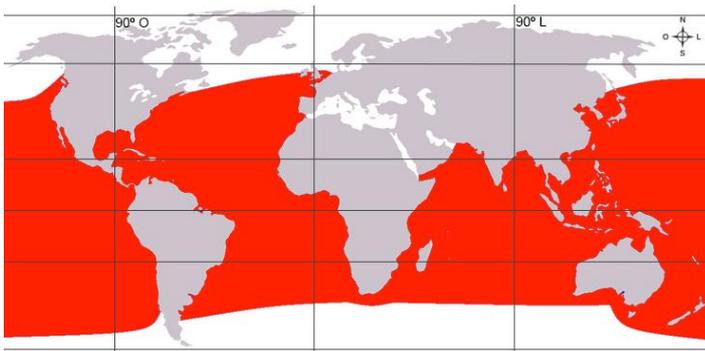
Mesoplodon europaeus



Águas tropicais do Atlântico Norte (mod. de Pitman, 2002; © CMS/GROMS).

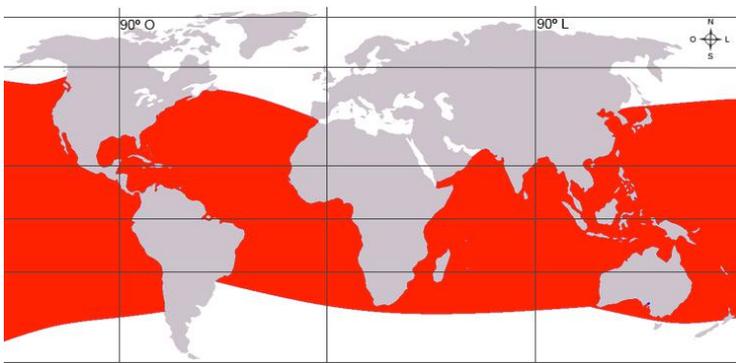
Família Kogiidae:

Kogia breviceps



Águas temperadas, tropicais e subtropicais em todo o mundo (mod. de MCALPINE (2002) © CMS/GROMS).

Kogia simus



Águas temperadas, tropicais e subtropicais em todo o mundo (mod. MCALPINE , 2002, © CMS/GROMS).