

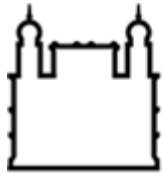
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e
Saúde

TREMATODA HETEROPHYIDAE: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA
E IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA

JULIANA NOVO BORGES

RIO DE JANEIRO
JUNHO DE 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Saúde

JULIANA NOVO BORGES

Trematoda Heterophyidae: caracterização genética e implicações
em saúde pública

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

Orientadora: Dr^a Cláudia Portes Santos Silva

Coorientador: Dr. Cláudio Lísias Mafra de Siqueira

Rio de Janeiro

Junho de 2016



INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Saúde

JULIANA NOVO BORGES

**Trematoda Heterophyidae: caracterização genética e
implicações em saúde pública**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Cláudia Portes Santos Silva

COORIENTADOR: Prof. Dr. Cláudio Lísias Mafra de Siqueira

Aprovada em: 15/06/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Simone Chincz Cohen (Instituto Oswaldo Cruz) - Presidente

Prof. Dr. Beatriz Brener de Figueiredo (Universidade Federal Fluminense)

Prof. Dr. José Luis Fernando Luque Alejos (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro)

Prof. Dr. Rosângela Rodrigues e Silva (Instituto Oswaldo Cruz)

Prof. Dr. Mária Cristina Nascimento Justo (Instituto Oswaldo Cruz)

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

B732 Borges, Juliana Novo

Trematoda heterophyidae: caracterização genética e implicações em
saúde pública / Juliana Novo Borges. – Rio de Janeiro, 2016.
xii, 101 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biodiversidade e Saúde, 2016.
Bibliografia: f. 70-83

1. DNA. 2. Zoonoses. 3. Parasitos. 4. Peixes. I. Título.

CDD 592.48

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Aos meus pais, Sônia e Antônio, e meus irmãos, Mariane, Laís, Helena e Hugo, pelo infinito carinho pelo apoio e disposição para me socorrer se necessário. Aos meus primos (Carol, Léo, Silvia, Bia e Dudu) e tios (Solange e Paulo) por terem me acolhido durante minha jornada longe de casa.

Ao meu namorado, Thales, pelo imenso carinho, por me dar força e sempre acreditar em meu potencial.

Aos meus amigos do LAPSA: Everton, Danielle, Luiz Felipe, Ronaldo, Karina, Viviane, Aline, Claudiane, Ana Carolina, Pedro, Maralina, Vanessa e Ana Cristina por toda a ajuda que sempre estiveram dispostos a me dar e por todos os momentos de descontração e alegria que me deram.

Aos meus orientadores, Dr^a Cláudia Portes e Dr Cláudio Mafra, pelos ensinamentos, pela atenção e a dedicação com que me orientaram.

À equipe do LAPEM e NUBIOMOL da Universidade de Viçosa, meus companheiros no pontapé inicial deste trabalho, em especial aos amigos Edvaldo, Cynthia e Rafael.

À toda a equipe do Laboratório de Patologia Aquática da Universidade de Copenhagen pelos ensinamentos científicos e culturais, em especial agradeço ao Dr. Kurt Buchmann por ter me recebido em seu laboratório e em sua casa e aos companheiros de trabalho Jakob, Qusay, Ole e Per por terem tornado o trabalho sempre descontraído.

Aos pescadores da colônia Z-13, em especial ao sr. Orlando Marins Filho, por terem nos ajudado nas coletas de barrigudinhos e fornecido de bom grado as tainhas utilizadas neste estudo.

Aos demais professores que me acrescentaram tanto durante minha jornada na Pós-graduação.

Aos professores que aceitaram de bom grado fazer parte da banca examinadora do presente trabalho.

Ao Instituto Oswaldo Cruz pelo apoio técnico através das Plataformas de Microscopia Eletrônica, PDTIS- Sequenciamento e ao LAPSA para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Instituto Oswaldo Cruz pelo financiamento ao projeto de pesquisa.

“O impossível existe até que alguém
duvide dele e prove o contrário. ”

Albert Einstein

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

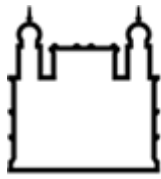
TREMATODA HETEROPHYIDAE: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Juliana Novo Borges

Os Trematoda Heterophyidae possuem ciclo de vida complexo em que moluscos e peixes atuam como hospedeiros intermediários e mamíferos e aves são hospedeiros definitivos. Suas metacercárias podem se encistar em diferentes órgãos de peixes, portanto há risco de infecção humana pela ingestão de pescado cru ou mal cozido. Estudos de viabilidade de espécies de metacercárias provenientes de países do norte da Europa e no Brasil são escassos. Embora haja estudos visando identificar e diagnosticar heterofídeos com potencial zoonótico em outros países utilizando ferramentas moleculares, muitas espécies ainda são negligenciadas. Neste trabalho testes de viabilidade de metacercárias foram feitos com *Ascocotyle (Phagicola) longa* encistadas na tainha no Brasil e *Cryptocotyle lingua* encistadas no bacalhau na Dinamarca, expostos a temperaturas extremas de congelamento e aquecimento (entre 180°C e -80°C). Além disso foi feita uma caracterização genética das espécies de *A. (P.) longa*, *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* e *Pygidiopsis macrostomum* encontradas em peixes da Lagoa Rodrigo de Freitas através de PCR e sequenciamento das regiões gênicas 18S rDNA, 28S rDNA, ITS2 rDNA e mtDNA *cox-1*. *P. macrostomum* também foi submetido a análises de microscopia de varredura a laser confocal (MVLIC). Os testes de viabilidade demonstraram que duas horas de incubação na maioria das temperaturas são suficientes para inativar metacercárias de *C. lingua* e *A. (P.) longa*, com exceção da temperatura de -10°C, em que foram necessárias 24 horas. As caracterizações genéticas realizadas resultaram em sequências que possuem pouca variabilidade intraespecífica entre os espécimes de *A. (P.) longa* e *A. (P.) pindoramensis*, com *P. macrostomum* possuindo três haplótipos para a região ITS2. As análises por MVLIC destacaram em *P. macrostomum* as fibras musculares diferenciadas ao redor da ventosa ventral. A comparação da nova sequência de *A. (P.) longa* com sequências da mesma espécie provenientes da Argentina e Israel depositadas no GenBank resultou em alta variabilidade para a região 18S rDNA, uma região muito conservada. Os resultados obtidos, indicam o congelamento de tainha e bacalhau como um procedimento altamente recomendável quando destinados ao consumo cru ou defumado a frio. Os estudos genéticos sugerem que *P. macrostomum* da Lagoa Rodrigo de Freitas e *A. (P.) longa* de diferentes regiões geográficas podem representar um complexo de espécies crípticas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

TREMATODA HETEROPHYIDAE: GENETIC CHARACTERIZATION AND IMPLICATIONS IN PUBLIC HEALTH

ABSTRACT

PhD THESIS IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Juliana Novo Borges

The Heterophyidae trematodes have complex life-cycles parasitizing molluscs and fishes as intermediate hosts and fish-eating mammals or birds as definitive hosts. The metacercariae may be encysted in different organs of fish and this represent a risk since humans can get infected for these parasites when they eat raw or under cooked fish. Studies on the viability of parasites from countries of North Europe as well as on parasites from Brazil are scarce. Although there are studies focusing on the identification and diagnosis of heterophyid flukes with zoonotic potential in other countries using molecular techniques, several species are still neglected. In this work viability tests were done with metacercariae of *Ascocotyle (Phagicola) longa* encysted in mullets from Brazil and *Cryptocotyle lingua* encysted in cod from Denmark exposed to extreme temperatures of freezing and cooking (180 °C a -80 °C). A genetic characterization of the species *A. (P.) longa*, *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* e *Pygidiopsis macrostomum* of fishes from Rodrigo de Freitas lagoon using PCR and sequencing from the genetic regions 18S rDNA, 28S rDNA, ITS2 rDNA e mtDNA *cox-1* was done. *P. macrostomum* was also analyzed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). The viability tests showed that two hours are sufficient to kill metacercariae in most of the temperatures, except for -10 °C in which were necessary 24 hours to inactivate the metacercarie. The genetic characterization of *A. (P.) longa* and *A. (P.) pindoramensis* showed low intraspecific variation among specimens; however, *P. macrostomum* had three haplotypes for the ITS2 rDNA region. The analysis by CLSM highlighted in *P. macrostomum* differential radial fibers around the ventral sucker. The comparison of our new sequence of *A. (P.) longa* and sequences of this species from Argentina and Israel deposited in the GenBank showed high variability for the 18S rDNA region, a very conserved region. Considering our results, freezing of mullets and cod is highly recommended when prepared for human consumption raw or subject to cold smoking and our genetic data suggest that *P. macrostomum* from Rodrigo de Freitas lagoon and *A. (P.) longa* from different geographic regions may represent a sibling species complex.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO GERAL _____	1
1.1 Taxonomia de Heterophyidae _____	2
1.1.1 <i>Ascocotyle (Phagicola) longa</i> _____	4
1.1.2 <i>Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis</i> _____	5
1.1.3 <i>Pygidiopsis macrostomum</i> _____	5
1.1.4 <i>Cryptocotyle lingua</i> _____	5
1.2 Ferramentas moleculares na identificação de Heterophyidae _____	6
1.3 Heterophyidae e zoonoses _____	11
2. JUSTIFICATIVA _____	12
3. OBJETIVOS _____	13
3.1 Objetivos gerais _____	13
3.2 Objetivos específicos _____	13
4 Capítulo 1 _____	14
Viabilidade de metacercárias de <i>Cryptocotyle lingua</i> e <i>Ascocotyle (Phagicola) longa</i> expostas a diferentes temperaturas de congelamento e aquecimento _	14
4.1 INTRODUÇÃO _____	14
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS _____	16
4.3 RESULTADOS _____	23
4.4 DISCUSSÃO _____	32
5 Capítulo 2: _____	36
Caracterização genética de Trematoda Heterophyidae de peixes da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro _____	36
5.1 INTRODUÇÃO _____	36
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS _____	38
5.3 RESULTADOS _____	44
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS _____	68
7 CONCLUSÕES _____	69
8 REFERÊNCIAS _____	70
9 ANEXOS _____	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de parasitos da família Heterophyidae. Adaptado de <http://www.cdc.gov/dpdx/heterophyiasis>. _____ 3

Figura 2: Lagoa Rodrigo de Freitas (Google images) _____ 3

Figura 3: *Ascocotyle (Phagicola) longa* visão ventral, adaptado de Scholz (1999). Abreviaturas: Ap- apêndice, C- ceco, E- espinhos, F- faringe, G- gonotil, O- ovário, Pf- pré-faringe, T- testículos, Ve- vesícula excretora, Vo- ventosa oral, Vt- vitelinos, VV- ventosa ventral. _____ 7

Figura 4: *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* vista ventral, adaptado de Simões et al. (2006). Abreviaturas: Ap- apêndice, C- ceco, F- faringe, G- gonotil, Pf- pré-faringe, T- testículos, Ve- vesícula excretora, VO- ventosa oral, Vt- vitelinos, VV- ventosa ventral. _____ 8

Figura 5: *Pygidiopsis macrostomum* vista ventral, adaptado de Simões et al. (2009). Abreviaturas: C- ceco, F- faringe, G- gonotil, Pf- pré-faringe, T- testículos, Ve- vesícula excretora, ventosa oral, Vt- vitelinos, VV- ventosa ventral. _____ 9

Figura 6: *Cryptocotyle lingua* vista ventral, adaptado de Stunkard (1930). Abreviaturas: C- ceco, F- faringe, T- testículos, ventosa oral, Vt- vitelinos, VV- ventosa ventral. _____ 10

Figura 7: Procedimentos para realização da digestão e preparo dos “sanduíches” de metacercárias (A) digestão (B) metacercárias vistas em microscópio estereoscópio após a digestão (C) músculo de tainha cortado, as metacercárias não são visíveis no músculo (D) ‘pool’ de metacercárias sendo colocadas no sanduíche. _____ 20

Figura 8: Metacercárias desencistadas e cistos vivos de *Ascocotyle (Phagicola) longa*. (A) cistos vivos (B) cisto com detalhe da ventosa oral (seta preta) e vesícula excretora (seta branca) (C) Metacercária desencistada com ventosa ventral em destaque (seta) (D) metacercária desencistada com espinhos da ventosa oral em destaque (seta). _____ 25

Figura 9: Microscopia eletrônica de varredura de *Ascocotyle (Phagicola) longa*. (A) metacercária controle desencistando (B) metacercária controle desencistada (C) detalhe da região anterior de uma metacercária controle (D) detalhe do tegumento com espinhos e ventosa ventral em uma metacercária controle (E) cisto exposto a -35°C por 24 horas, as setas indicam orifícios no cisto (F) metacercária exposta a -20°C por 30 minutos, as setas indicam fissuras no tegumento (G) metacercária exposta a -20°C por 30 minutos, o círculo indica uma região em que houve perda de espinhos. _____ 26

Figura 10: Metacercárias de *Cryptocotyle lingua* encistadas na pele e músculo de bacalhau. (A) Pele apresentando diversos cistos (B) Músculo externo apresentando alguns cistos (C) Músculo interno sem cistos. A escala é dada em centímetros (cm). _____ 28

Figura 11: Metacercárias encistadas de *Cryptocotyle lingua*. (A) Metacercária morta (considerada não viável após incubação a -20°C por 2 h) apresentando perda de características morfológicas. (B) Metacercária viva encistada apresentando ventosa oral, faringe e vesícula excretora. ____ 28

Figura 12: Microscopia Eletrônica de Varredura de *Cryptocotyle lingua* exposto a temperaturas de congelamento e aquecimento. (A) Cisto exposto a -80°C por 30 min. (B) Cisto exposto a -20°C por 30 min. (C) Cisto exposto a 70°C por 5 min. (D) Cisto exposto a 70°C por 1 h (E) e (G) Metacercária desencistada exposta a -80°C por 30 min. (F) Metacercária desencistada exposta a -20°C por 1 h. (H) Metacercária desencistada exposta a -80°C por 1 min. _____ 31

Figura 13: Imagens de MVLC de *Pygidiopsis macrostomum* adulto. (A) Visão ventral; (B) ventosa oral e pré-faringe; (C) visão externa das fibras do tegumento; (D) pré-faringe e faringe; (E) sistema reprodutor e ventosa ventral; (F) ventosa ventral com fibras radiais. Abreviações: (os) ventosa oral, (lf) fibras longitudinais, (p) faringe, (e) esôfago, (ic) ceco intestinal, (vs) ventosa ventral, (s) espinhos, (cf) fibras circulares, (df) fibras diagonais, (g) gonotil, (o) ovário, (ev) vesícula excretora, (t) testículos, (rf) fibras radiais. Escala: A, F=50µm, B,C,F=20µm, D= 10µm. _____ 46

Figura 14: Imagens de MVLC de metacercárias de *Pygidiopsis macrostomum*. (A) Visão do tegumento externo; (B) Visão ventral com células flama; (C - D) sistema reprodutor; (E) Vesícula excretora (F) poro excretor. Abreviações: (os) ventosa oral, (lf) fibras longitudinais, (p) faringe, (e) esôfago, (ic) ceco intestinal, (vs) ventosa ventral, (s) espinhos, (cf) fibras circulares, (df) fibras

diagonais, (g) gonotil, (o) ovário, (ev) vesícula excretora, (t) testículos (fc) células flama. Escala: A-F=50µm. _____ 47

Figura 15: Imagens de MVLC de metacercárias de *Pygidiopsis macrostomum*. As setas indicam gânglios imunoreativos à serotonina na região anterior (A) e ao redor da ventosa ventral (B). Escala: A-B=50µm _____ 48

Figura 16: Reconstrução filogenética utilizando ML baseada nos alinhamentos de sequências de *A. (P.) longa*, *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum* deste trabalho (*) com sequências de Heterophyidae do GenBank para a região 18S rDNA. Os valores na frente dos nós representam a porcentagem de 'bootstrap'. *Echinostoma revolutum* representa o grupo externo. _____ 51

Figura 17: Reconstrução filogenética utilizando ML baseada nos alinhamentos de sequências de *A. (P.) longa*, *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum* deste trabalho (*) com sequências de Heterophyidae do GenBank para a região 28S rDNA. Os valores na frente dos nós representam a porcentagem de 'bootstrap'. *Echinostoma revolutum* representa o grupo externo. _____ 52

Figura 18: Reconstrução filogenética utilizando ML baseada nos alinhamentos de sequências de *A. (P.) longa*, *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum* deste trabalho (*) com sequências de Heterophyidae do GenBank para a região ITS2 rDNA. Os valores na frente dos nós representam a porcentagem de 'bootstrap'. *Proisorhynchus longisaccatus* representa o grupo externo. ____ 54

Figura 19: Reconstrução filogenética utilizando ML baseada nos alinhamentos de sequências de *A. (P.) longa*, *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum* deste trabalho (*) com sequências de Heterophyidae do GenBank para a região mtDNA *cox-1*. Os valores na frente dos nós representam a porcentagem de 'bootstrap'. *Fasciola hepatica* representa o grupo externo. ____ 57

Figura 20: Reconstrução filogenética utilizando ML baseada nos alinhamentos de sequências de *A. (P.) longa*, *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum* deste trabalho (*) com sequências de Heterophyidae e Opisthorchiidae do GenBank para a região ITS2 rDNA. Os valores na frente dos nós representam a porcentagem de 'bootstrap'. *Proisorhynchus longisaccatus* representa o grupo externo. _____ 58

Figura 21: Reconstrução filogenética utilizando ML baseada nos alinhamentos de sequências de *A. (P.) longa*, *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum* deste trabalho (*) com sequências de Heterophyidae e Opisthorchiidae do GenBank para a região ITS2 rDNA. Os valores na frente dos nós representam a porcentagem de 'bootstrap'. *Fasciola hepatica* representa o grupo externo. _____ 59

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Relação de temperaturas e tempos utilizados em cada experimento, o X representa a combinação tempo e temperatura..... 19
- Tabela 2: Porcentagem de metacercárias de *A. (P.) longa* mortas para cada tempo de incubação e temperatura (resultados baseados nas médias das três réplicas, cada uma contendo dez metacercárias). A cor vermelha indica que todas as metacercárias foram consideradas inviáveis. 27
- Tabela 3: Porcentagem de metacercárias de *C. lingua* mortas em diferentes tempos e temperaturas de incubação. A cor vermelha indica morte de todas as metacercárias. (2a) Metacercárias foram isoladas por digestão em pspina antes da incubação. (2b) Metacercárias foram incubadas no tecido do peixe (in situ) e depois isoladas por digestão com tripsina. 30
- Tabela 4: Distâncias p (convertidas em porcentagem)entre as Sequências de *Ascocotyle (Phagicola) longa* obtidas neste trabalho e sequências de *A. (P.) longa* e *A. (P.) nana* depositadas no GenBank para a região 18S rDNA, baseadas em alinhamento com 308 pares de bases.... 51
- Tabela 5: Distância p entre as sequências de *Pygidiopsis macrostomum* obtidas neste estudo expressas em porcentagem. As cores representam os haplótipos encontrados: Azul-hapl1, laranja-hapl2, verde hapl3. 54

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os Trematoda Rudolphi, 1808 pertencentes à subclasse Digenea Carus, 1863 são endoparasitos que possuem ciclo de vida complexo em que a vasta maioria usa moluscos como primeiro hospedeiro intermediário e vertebrados como hospedeiros definitivos (Gibson, 2002). Nesta subclasse, a superfamília Opisthorchioidea Looss, 1899 é composta por três famílias: Cryptogonimidae Ward, 1917, Heterophyidae Leiper, 1909 e Opisthorchiidae Looss, 1899 e possui várias espécies de importância em Saúde Pública. As espécies destas famílias possuem ciclos de vida muito parecidos em que passam por três hospedeiros: um molusco como primeiro hospedeiro intermediário, peixes como segundo hospedeiro intermediário e mamíferos e aves como hospedeiros definitivos (Cribb et al. 2001, Bray 2008) (Figura 1). Os Trematoda da família Heterophyidae alvo deste estudo, parasitam o intestino de seus hospedeiros definitivos, com as metacercárias desses referidas em diversas espécies de peixes (Buchmann 1986, Oliveira et al. 2007, Simões 2009, Pérez et al. 2012).

No Rio de Janeiro, a Lagoa Rodrigo de Freitas é um ambiente estuarino, onde o ciclo de vida de algumas espécies de heterofiídeos já foram elucidados (Simões 2009, Simões et al. 2009, Simões et al. 2010). É um ambiente propício para a manutenção dos ciclos pois nele coabitam os diferentes hospedeiros que abrigam os parasitos em seus diversos estádios de vida (Figura 2).

Os ciclos de vida das espécies de Heterophyidae previamente estudadas na Lagoa Rodrigo de Freitas incluem como primeiro hospedeiro intermediário o molusco *Heleobia australis* (d'Orbigny, 1835) no qual as rédias por reprodução assexuada produzem cercárias. As cercárias eliminadas são ingeridas por peixes barrigudinhos *Poecilia vivípara* (Bloch & Schneider, 1801), *Phalloptychus januarios* (Hensel, 1868) e *Jenysia multidentata* (Jenys, 1842), além da tainha *Mugil liza* Valenciennes, 1836. Os hospedeiros definitivos são mamíferos e aves que se alimentam de peixes da lagoa e assim acabam adquirindo estes parasitos (Simões 2009).

As metacercárias de heterofiídeos em geral podem se encistar em diferentes órgãos do peixe como baço, coração, mesentério, brânquias e musculatura. A ocorrência de metacercárias no músculo de peixes de interesse comercial é objeto de atenção pois os humanos podem ser infectados quando

há ingestão de pescado cru ou mal cozido contendo larvas viáveis destes parasitos (Babbott et al. 1961, Rausch et al. 1967, Chieffi et al. 1990, Chieffi et al. 1992).

Dentre os heterofiídeos mais prevalentes na Lagoa Rodrigo de Freitas estão *Pygidiopsis macrostomum* Travassos, 1928, *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* (Travassos, 1928) e *Ascocotyle (Phagicola) longa* Ransom, 1920, sendo que esta última espécie apresenta potencial zoonótico pois as metacercárias são encontradas encistadas na musculatura de tainhas (Chieffi 1990, Simões et al. 2010, Santos et al. 2013).

Em regiões costeiras temperadas e árticas tanto na América do Norte quanto na Europa ocorre outra espécie de heterofiídeo, *Cryptocotyle lingua* (Crepelin, 1825). O ciclo desta espécie inclui como primeiro hospedeiro intermediário o molusco *Littorina littorea* (Linnaeus, 1758) que libera cercárias que infectam e se transformam em metacercárias em diferentes espécies de peixes de importância comercial, dentre os quais o bacalhau (*Gadus morhua* Linnaeus, 1758) (Køie 1984, Buchmann 1986, Kristoffersen 1988, Mellegaard e Lang, 1999). Aves marinhas são os hospedeiros definitivos, mas existem relatos de adultos de *C. lingua* infectando mamíferos como raposas, cães e gatos (Guildal 1968, Saeed et al. 2006, Christensen e Roth 1946, Christensen e Roth 1949).

1.1 Taxonomia de Heterophyidae

A taxonomia de Trematoda Digenea tem sido reavaliada ao longo dos anos e várias tentativas no intuito de encontrar critérios úteis para a classificação do grupo foram feitas desde o século XIX (La Rue 1957, Yamaguti 1975, Gibson, 2002). Arranjo de ventosas, morfologia de cercárias e padrões do ciclo de vida foram algumas das características propostas em classificações mais antigas, porém filogenias baseadas nestas características acabavam gerando dados conflitantes que dificultavam a classificação e não refletiam padrões evolutivos. Em vista disso, as classificações mais atuais baseiam-se majoritariamente em características morfológicas e genéticas (Gibson, 2002).

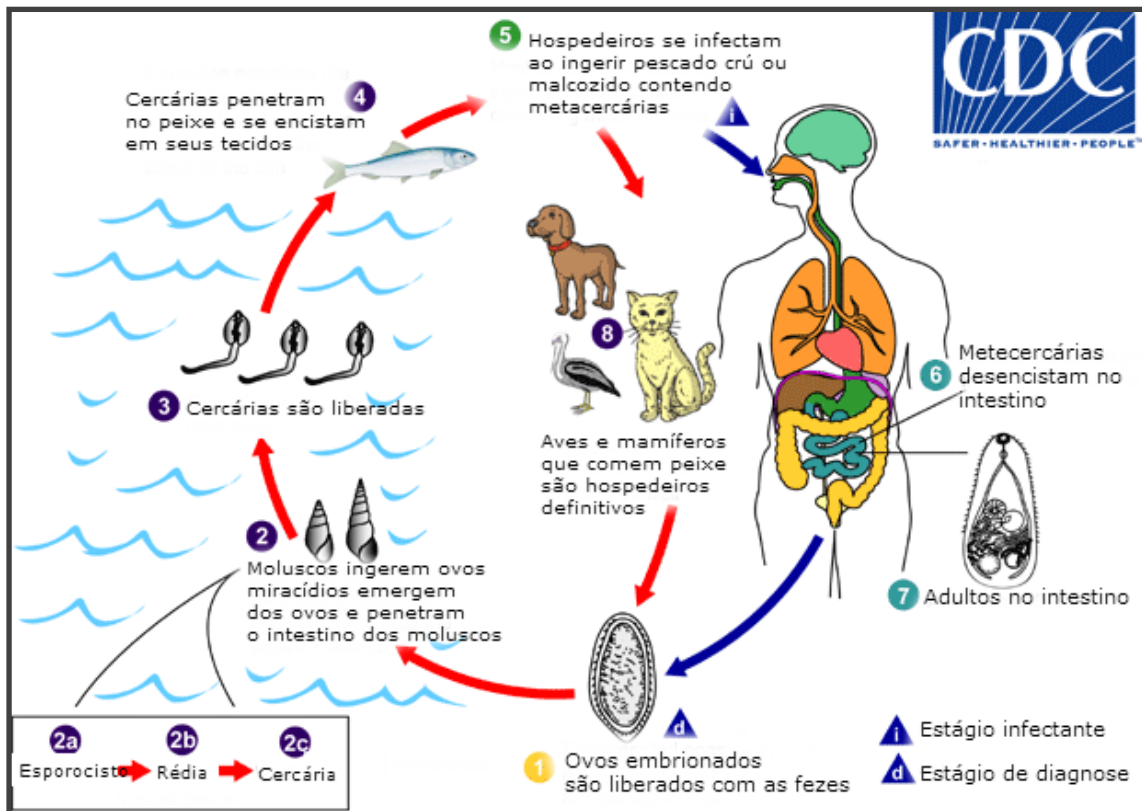


Figura 1: Ciclo de vida de parasitos da família Heterophyidae. Adaptado de <http://www.cdc.gov/dpdx/heterophyiasis>.



Figura 2: Lagoa Rodrigo de Freitas (Google images)

As características que atualmente definem a família Heterophyidae foram revisadas por Witenberg (1929) e Yamaguti (1971) e incluem as estruturas do complexo genital, como por exemplo, a parte terminal dos ductos genitais, ventosa ventral e gonotil de parasitos adultos (Pearson 2008).

Ao todo são 37 gêneros de heterofiídeos caracterizados morfologicamente, sendo dois deles *incertae sedis* (Pearson 2008). Apesar de haver muitos trabalhos descrevendo as espécies de Heterophyidae com base na morfologia, os trabalhos com caracterização genética ainda são escassos, se concentrando principalmente em espécies de interesse médico e veterinário (Thaenkham et al. 2010, Dung et al. 2013, Lee et al. 2013, Pornruseetairatn et al. 2015).

Neste trabalho, as espécies abaixo relacionadas, já caracterizadas morfologicamente, serão alvo de estudos moleculares:

1.1.1 *Ascocotyle (Phagicola) longa*

Esta espécie teve seu ciclo de vida elucidado na Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, em trabalhos anteriores feitos pela equipe do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA) onde foi encontrada parasitando 100% das tainhas deste ambiente (Simões 2009, Santos et al. 2013). A espécie foi redescrita por Scholz (1999) e apesar de possuir uma grande variedade de hospedeiros definitivos, suas metacercárias parecem infectar somente peixes da família Mugilidade como hospedeiros intermediários (Scholz 1999, Simões et al. 2009, Martorelli, 2012). *Ascocotyle (Phagicola) longa* possui corpo piriforme e tegumento totalmente coberto por pequenos espinhos em forma de pente, possui uma fileira composta por 16 espinhos ao redor da ventosa oral que tem longo apêndice posterior. Os cecos intestinais alcançam a altura do ovário e possui gonotil bipartido com dois lobos contendo de quatro a oito bolsas (Figura 3). A espécie é considerada cosmopolita e já foi descrita nas Américas, África, Europa e Oriente Médio (Scholz 1999, Simões et al. 2010, Santos et al. 2013, Martorelli 2012). Apesar de sua grande distribuição trabalhos genéticos desta espécie são escassos (Dzikowski et al. 2004, Alda et al. 2015).

1.1.2 *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis*

Esta espécie era considerada como pertencente ao gênero *Pygidiopsis* até recentemente quando foi redescrita por Simões et al. (2006), os quais descreveram a presença de apêndice curto posterior à ventosa oral, característica diagnóstica do gênero *Ascocotyle* e motivo pelo qual propuseram a nova classificação. Além desta característica *A. (P.) pindoramensis* possui corpo piriforme com espinhos recobrendo todo o tegumento, exceto na região dorsal inferior, com ventosa oral sem espinhos, cecos intestinais longos e recurvados alcançando a altura do ovário e gonotil com 13 a 16 bolsas dispostas em uma única fileira horizontal (Simões et al. 2006) (Figura 4). A distribuição geográfica da espécie parece se restringir às Américas, tendo como hospedeiros intermediários peixes Cyprinodontiformes e como hospedeiros definitivos aves piscívoras. Até o momento nenhum estudo genético foi realizado para caracterizar esta espécie.

1.1.3 *Pygidiopsis macrostomum*

Esta é uma espécie pouco estudada, originalmente descrita por Travassos em 1928 e depois redescrita por Simões et al. (2005). Seu ciclo de vida na Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ, foi elucidado por Simões et al. (2009). Espécimens adultos de *P. macrostomum* tem corpo piriforme com tegumento espinhoso, ventosa oral sem espinhos, cecos intestinais atingindo a altura dos testículos e gonotil com oito a nove bolsas (Simões et al. 2005) (Figura 5). Até o momento esta espécie foi descrita apenas no Brasil e referida em Cuba (Zdzitowiecki e Rutkowska 1980), sugerindo que sua distribuição geográfica seja restrita às Américas. Os hospedeiros definitivos descritos foram o rato *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) e o morcego *Noctilio leporinus mastivus* (Vahl, 1797) e peixes Cyprinodontiformes descritos como seus hospedeiros intermediários. Até o momento nenhum estudo genético foi feito para esta espécie.

1.1.4 *Cryptocotyle lingua*

Espécie descrita por Crepin em 1825 com material proveniente do intestino de *Larus marinus* Linnaeus, 1758, com redescições feitas por Jägerskiöld (1899) e Linton (1915). *Cryptocotyle lingua* tem corpo piriforme, com tegumento

coberto por espinhos, ventosa oral sem espinhos e cecos intestinais curtos atingindo a altura da ventosa ventral (Stunkard 1930, Rees 1978) (Figura 6). A espécie foi originalmente descrita com presença de gonotil mas Pearson (2008) indicou que esta estrutura é ausente. Possui distribuição geográfica restrita aos ambientes costeiros da Europa e América do Norte (Williams et al. 1994). Apesar de diversas sequências para a região mtDNA *cox-1* desta espécie encontrarem-se depositadas em bancos de dados biológicos, são poucas as sequências com outros marcadores moleculares.

1.2 Ferramentas moleculares na identificação de Heterophyidae

Técnicas moleculares utilizadas para identificação e diferenciação de populações de Digenea começaram a ser utilizadas nos anos 1980. Em sua maioria, eram técnicas que não tinham como fim a obtenção de sequências nucleotídicas, como por exemplo, hibridização de DNA e RFLP (Restriction Fragment Length Polimorfism) aplicadas principalmente em espécies de interesse médico e veterinário (Fletcher et al. 1980, Blair e McManus 1989, Kaukas et al. 1994). Com a popularização da PCR e sequenciamento essas técnicas foram sendo abandonadas e poucos trabalhos são atualmente realizados utilizando-se estas ferramentas (Pauly et al. 2003, Thaenkham et al. 2011a).

Trabalhos de filogenia de Platyhelminthes foram feitos utilizando sequenciamento direto de regiões gênicas das subunidades do DNA ribossomal, porém devido ao alto grau de conservação destas regiões gênicas as relações entre taxa inferiores como famílias e gêneros permaneceram problemáticas (Blair et al. 1996, Olson et al. 2003, Olson e Tkach 2005). No intuito de resolver questões problemáticas e identificar espécies muito próximas ou crípticas outras regiões gênicas como ITS do DNA ribossomal, *Cox 1* e *NADH* do DNA mitocondrial começaram a ser utilizadas para estudos filogéticos (Olson e Tkach 2005, Králová-Hromadová et al. 2008, Skov et al. 2009).

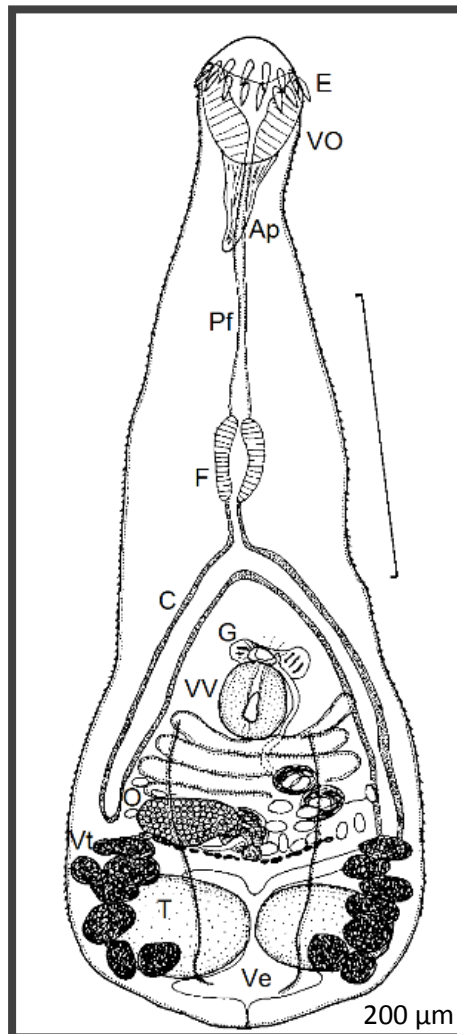


Figura 3: *Ascocotyle (Phagicola) longa* visão ventral, adaptado de Scholz (1999).
Abreviaturas: Ap- apêndice, C- ceco, E- espinhos, F- faringe, G- gonostil, O- ovário,
Pf- pré-faringe, T- testículos, Ve- vesícula excretora, Vo- ventosa oral, Vt- vitelinos,
VV- ventosa ventral.

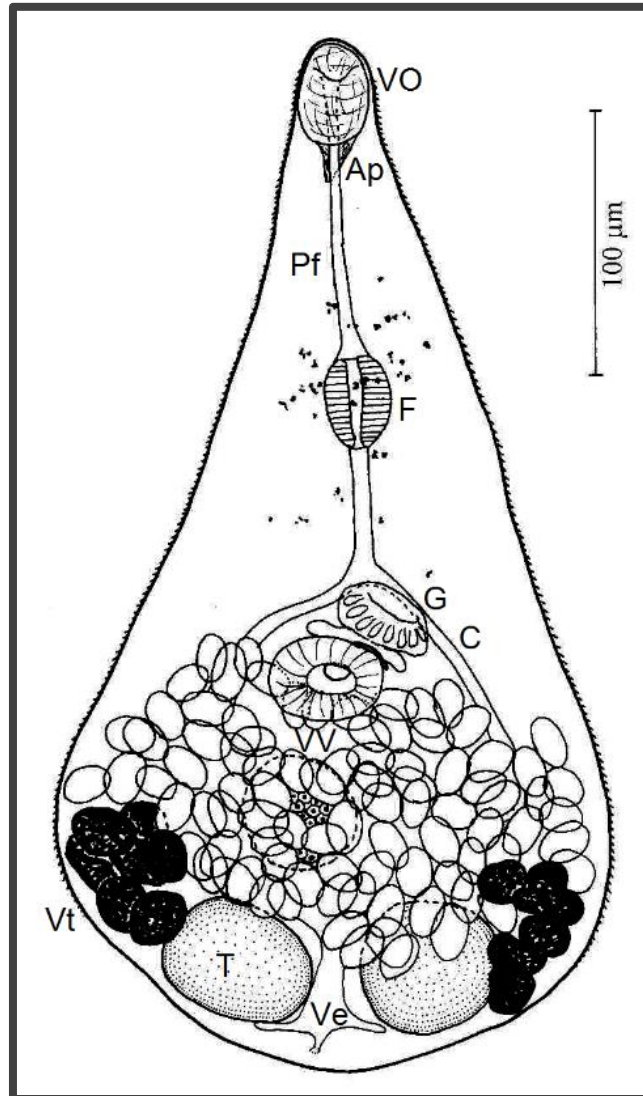


Figura 4: *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* vista ventral, adaptado de Simões et al. (2006). Abreviaturas: Ap- apêndice, C- ceco, F- faringe, G- gonotil, Pf- pré-faringe, T- testículos, Ve- vesícula excretora, VO- ventosa oral, Vt- vitelinos, VV- ventosa ventral.

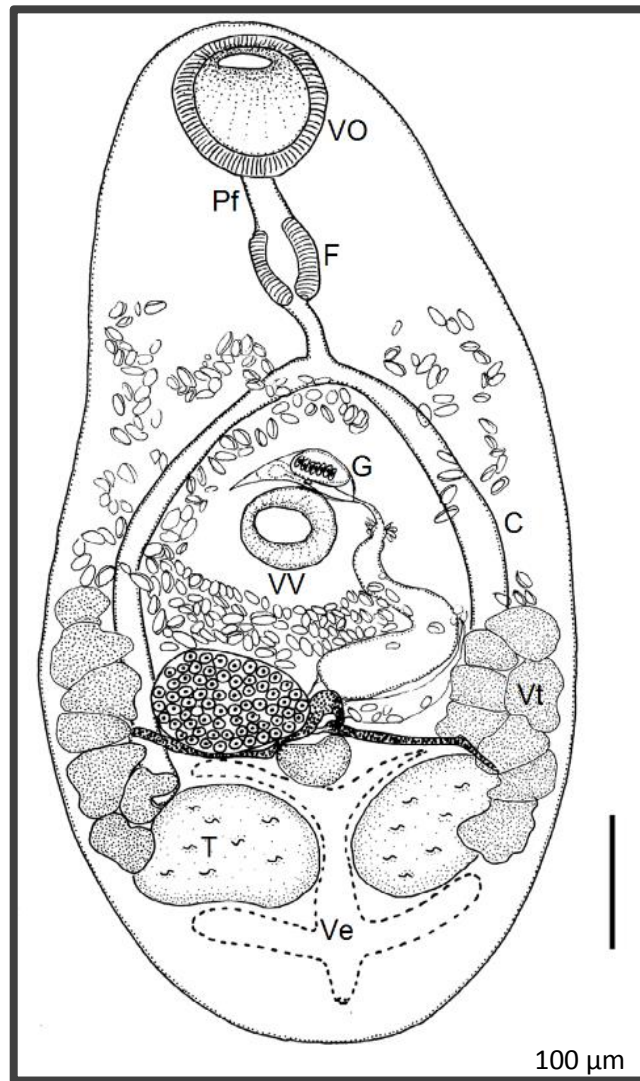


Figura 5: *Pygidopsis macrostomum* vista ventral, adaptado de Simões et al. (2009). Abreviaturas: C- ceco, F- faringe, G- gonotil, Pf- pré-faringe, T- testículos, Ve- vesícula excretora, ventosa oral, Vt- vitelinos, VV- ventosa ventral.

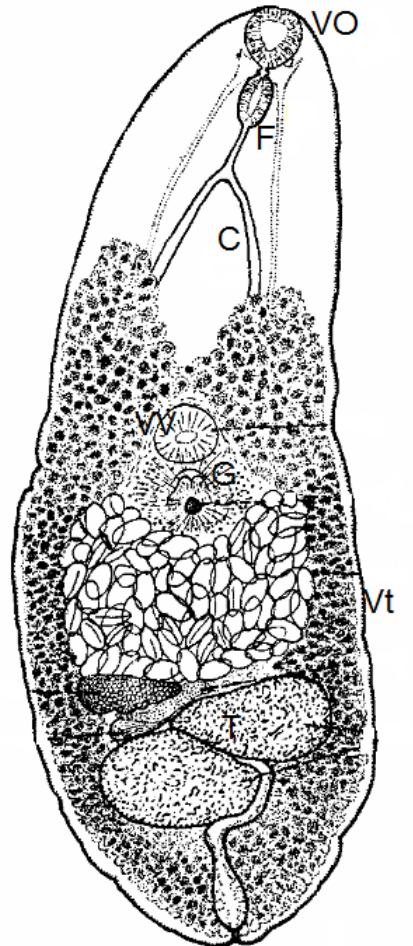


Figura 6: *Cryptocotyle lingua* vista ventral, adaptado de Stunkard (1930).
Abreviaturas: C- ceco, F- faringe, T- testículos, ventosa oral, Vt- vitelinos,
VV- ventosa ventral. Barra = 400µm.

Trabalhos recentes realizados com heterofiídeos têm demonstrado que mesmo regiões altamente variáveis como mtDNA *cox-1* não são capazes de resolver a separação de Heterophyidae e Opisthorchiidae, demonstrando uma relação filogenética muito próxima entre as duas famílias (Thaenkham et al. 2011b, Thaenkham et al. 2012, Chontanarith et al. 2014). Os avanços recentes nas técnicas de sequenciamento de genomas podem, no entanto, ajudar a encontrar novas regiões gênicas mais apropriadas para elucidar relações entre taxa próximos (Olson e Tkach 2005, Lee et al. 2013). Até o momento apenas duas espécies de Heterophyidae possuem seus genomas mitocondriais disponíveis, *Metagonimus yokogawai* (Katsurada, 1912) e *Haplorchis taichui* (Nishigori, 1924) (Lee et al. 2013).

1.3 Heterophyidae e zoonoses

Estima-se que 40 milhões de pessoas no mundo estejam sob o risco de contrair trematodíases provenientes de alimentos. Estas infecções são adquiridas pelo consumo de alimentos crus ou mal cozidos (Fried et al. 2004, Chai et al. 2005). Os parasitos da família Heterophyidae utilizam peixes como segundo hospedeiro intermediário onde metacercárias encontram-se encistadas em diversos órgãos, inclusive a musculatura (Chai et al. 2005). Infecções humanas por heterofiídeos são comuns e amplamente referidas em países da Ásia, Europa, América do Norte e também no Brasil e, portanto, com alto potencial zoonótico (Okumura et al. 1999, Fried e Abruzzi 2010, Toledo et al. 2012).

Embora muitos estudos, inclusive com ferramentas moleculares, visando identificar e diagnosticar heterofiídeos com potencial zoonótico tenham sido feitos em outros países utilizando ferramentas moleculares, muitas espécies ainda são negligenciadas (Dzikowski et al. 2004, Skov et al. 2009). No Brasil, apesar de *Ascocotyle (Phagicola) longa*, encontrado em diferentes espécies de peixes da família Mugilidae (Conceição et al. 2000, Oliveira et al. 2007, Simões et al. 2010, Pérez et al. 2012, Santos et al. 2013), ser reconhecido como principal agente causador de heterofiíase humana, ainda não dispomos de estudos moleculares de heterofiídeos no Brasil que possam auxiliar no diagnóstico destas parasitoses.

2. JUSTIFICATIVA

Trematódeos de peixes referidos como um risco à saúde humana incluem metacercárias das famílias Heterophyidae, Echinotomatidae e Opisthorchiidae. Embora haja inúmeros estudos sobre a biologia e controle de espécies tropicais na Ásia, visando a tecnologia de alimentos, não existem estudos similares sobre algumas espécies do norte da Europa, como é o caso de *C. lingua*. Na América do Sul, os estudos de viabilidade de metacercárias de *A. (P.) longa* são escassos, necessitando de padronização metodológica. Neste estudo será feito um teste de viabilidade expondo metacercárias de *C. lingua* e *A. (P.) longa* a temperaturas extremas de congelamento e cocção visando fornecer subsídios para medidas profiláticas e de controle em casos de heterofíase humana.

Os Heterophyidae ocorrem em alta prevalência em peixes de área estuarina do Rio de Janeiro (Simões et al. 2009, 2010). No entanto, as espécies *Ascocotyle (Phagicola) longa*, *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* e *Pygidiopsis macrostomum*, recentemente redescritas, ainda não foram estudadas geneticamente. De modo semelhante, *C. lingua* que parasita o bacalhau no norte da Europa, mesmo sendo uma espécie muito conhecida, ainda necessita de dados genéticos adicionais.

O uso de técnicas moleculares para identificação de espécies serve como uma importante ferramenta para análises diagnósticas específicas. Dessa forma, a caracterização genética realizada com *A. (P.) longa*, *A. (P.) pindoramensis*, *P. macrostomum* e *C. lingua* contribuirá para o conhecimento da taxonomia molecular destes trematódeos, sendo que as espécies brasileiras já constam da Lista de Classificação de Risco de Agentes Biológicos do Ministério da Saúde (2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar a viabilidade de metacercárias de Heterophyidae encistadas em músculo de tainhas (*Mugil liza*) do Brasil e do bacalhau (*Gadus morhua*) da Dinamarca e caracterizar o perfil genético de adultos de *Ascocotyle (Phagicola) longa*, *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* e *Pygidiopsis macrostomum* e metacercárias de *Cryptocotyle lingua*.

3.2 Objetivos específicos

Testar a viabilidade de metacercárias de *Ascocotyle (Phagicola) longa* de tainhas expostas a diferentes temperaturas de congelamento e aquecimento.

Testar a viabilidade de metacercárias de *Cryptocotyle lingua* de bacalhau expostas a diferentes temperaturas de congelamento e aquecimento.

Caracterizar o perfil genético de *Ascocotyle (Phagicola) longa*.

Caracterizar o perfil genético de *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis*.

Caracterizar o perfil genético de *Pygidiopsis macrostomum*.

Adicionar novos dados genéticos de *Cryptocotyle lingua*

4 Capítulo 1

Viabilidade de metacercárias de *Cryptocotyle lingua* e *Ascocotyle (Phagicola) longa* expostas a diferentes temperaturas de congelamento e aquecimento.

4.1 INTRODUÇÃO

Estima-se que 18 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas por trematódeos provenientes do pescado, sendo que estas infecções são mais comuns em certas regiões como no sul e sudeste asiático (Chai et al 2005). Com o aumento da popularidade da culinária asiática (e consequentemente da ingestão de pescado cru) o risco de infecção têm crescido consideravelmente em várias regiões do mundo (Chai et al 2005; Fried e Abruzzi 2010; Toledo et al 2012).

Dentre os trematódeos que utilizam em seus ciclos de vida peixes como hospedeiros intermediários estão os membros da família Heterophyidae. Diversos gêneros desta família já foram referidos infectando humanos: *Apophallus* Lühe, 1909, *Centrocestus* Looss 1899, *Cryptocotyle* Lühe, 1899, *Diorchitrema* Witenberg, 1929, *Haplorchis* Looss, 1899, *Heterophyes* Cobbold, 1866, *Heterophyopsis* Tubanguí & Africa, 1938, *Metagonimus* Katsurada, 1912, *Phagicola* Faust, 1920, *Procerovum* Onji & Nishio, 1916, *Pygidiopsis* Looss, 1907, *Stellantchasmus* Onji & Nishio, 1916 e *Stictodora* Looss, 1899 (Fried et al 2004; Toledo et al 2012). Normalmente as infecções que apresentam baixa parasitemia são assintomáticas, porém altas cargas parasitárias podem acarretar em inflamação e ulceração da mucosa com eventual necrose superficial levando à um quadro clínico de diarreia com fezes ricas em muco, dores abdominais, anorexia, náusea e vômitos (Fried et al 2004). Casos em que ocorre morte de pacientes são raros e normalmente estão ligados à embolia causada por ovos do parasito que podem atingir vasos que irrigam o coração, cérebro e medula espinhal (MacLean et al 1999; Marty e Andersen 2000; Fried et al. 2004).

O controle destas zoonoses é considerado difícil visto o complexo ciclo de vida destes parasitos, passando por diversos hospedeiros, aliado a situações de

pobreza, degradação ambiental e aspectos culturais que tornam impraticável uma intervenção pontual na tentativa de interrupção dos ciclos (MacLean et al 1999; Chai et al 2005).

A ocorrência de metacercárias de *A. (P.) longa* em tainhas é conhecida em diversos estados do Brasil (Conceição et al. 2000, Oliveira et al. 2007, Simões et al. 2010, Pérez et al. 2012, Santos et al. 2013), e sabe-se que 100% das tainhas provenientes da Lagoa Rodrigo de Freitas encontram-se parasitadas com metacercárias desta espécie (Santos et al 2013). No Brasil, casos de heterofíase humana foram referidos em São Paulo, tendo como agente *A. (P.) longa*. Casos positivos foram reportados em 102 pacientes que haviam ingerido tainhas cruas em meses anteriores ao diagnóstico (Chieffi et al 1990, 1992; Antunes e Almeida-Dias 1994).

Em alguns países existem documentos elaborados para garantir a qualidade do pescado e inativação de parasitos. O FDA (Food and Drugs Administration) e a EFSA (European Food Safety Authority) consideram o congelamento do pescado a -20°C por 24 horas tempo suficiente para eliminação de parasitos (EFSA 2004, FDA 2010, EFSA 2011). Porém, alguns métodos também citados nestes documentos como a defumação fria podem não ser suficientes para a inativação de parasitos. No Brasil ainda não há legislação específica regulamentando procedimentos para inativação de parasitos no pescado, apenas notas de esclarecimento quando ocorrem surtos esporádicos de parasitos, como o registrado em 2005 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Estudos de viabilidade de espécies de metacercárias provenientes de países do Norte da Europa não são relatados, já estudos de viabilidade com metacercárias ocorrendo no Brasil ainda são escassos (Rodrigues et al. 2015).

Buscando suprir esta lacuna realizamos incubações em temperaturas de cozimento e de congelamento para testar a viabilidade de duas espécies de heterofídeos, *A. (P.) longa* de tainhas do Brasil e *C. lingua* de bacalhau da Dinamarca. Os testes com *C. lingua* foram realizados durante os quatro meses de doutorado sanduíche na Universidade de Copenhague e já foram publicados em revista indexada (anexo I).

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Coleta de peixes no Rio de Janeiro

Um total de 15 peixes *Mugil liza* foram adquiridos com os pescadores da colônia Z13 na Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro – RJ, entre dezembro de 2015 e fevereiro de 2016. Esta coleta foi aprovada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, licença no. 15898-1). As tainhas frescas foram trazidas em gelo ao Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental onde foram medidas e pesadas. Os peixes apresentaram tamanho médio de 39,5 (\pm 5,7) cm e peso médio de 561 (\pm 193) g. Inicialmente foram feitos seis filés da musculatura de três peixes para fazer uma estimativa das metacercárias no tecido. O baço e coração dos demais peixes também foram separados para serem digeridos, tendo em vista que estes são os órgãos de maior prevalência de metacercárias de *A. (P.) longa* (Santos et al. 2013). Com a musculatura foram feitos posteriormente pequenos filés de aproximadamente 2,5 x 2,5 cm que foram mantidos sob refrigeração para uso nas incubações subsequentes.

4.2.2 Coleta de peixes em Copenhagen, Dinamarca

Um total de 25 peixes *Gadus morhua* foram comprados frescos nas peixarias locais de Copenhagen e foram levados para o Laboratório de Patologia Aquática da Universidade de Copenhagen. Os peixes apresentaram peso médio de 2,074 (\pm 0,513) Kg e tamanho médio de 63,4 (\pm 6,2) cm. Inicialmente foram feitos filés de bacalhau e após a pele ter sido retirada, os filés foram divididos em musculatura interna e externa. Pele, musculatura interna e musculatura externa foram digeridos para fazer uma estimativa da infecção por metacercárias de *C. lingua* em cada parte, tendo em vista que as metacercárias ocorrem com maior frequência sob a pele (Lysne et al. 1994).

4.2.3 Digestão dos órgãos

Tainha

Uma solução de digestão contendo 6 mL de HCl, 9 g de NaCl e 10 g de Pepsina (Bela Vista, Brasil) diluídos em 1L de água fervente foi preparada. O baço e o coração de três tainhas (*M. liza*) foram retirados em cada experimento, pesados, cortados e colocados em 400 mL de solução de digestão sob agitação de 300 rpm a 37° C durante pelo menos duas horas (Figura 7^a)

Ao término da digestão a solução foi coada em peneira com malha de 20 µm e metacercárias de *A. (P.) longa* foram lavadas em solução fisiológica 0,7% (Figura 7B). As metacercárias foram identificadas através das características morfológicas descritas em Simões et al. (2010) e armazenadas sob refrigeração em geladeira até o dia seguinte para uso nas incubações.

Bacalhau

As amostras de pele ou musculatura de bacalhau (*G. morhua*) (máx. 50g) foram digeridas em 500 mL de solução de digestão (a mesma do item acima, porém com pepsina Orthana A/S, Dinamarca) a 37 °C sob agitação de 200 rpm por duas horas. As amostras digeridas foram coadas em peneiras com malha de 50 µm e metacercárias de *C. lingua* foram lavadas em solução fisiológica 0,9%. As metacercárias identificadas através das características morfológicas descritas em Linton (1915) e Stunkard (1929, 1930) foram armazenadas sob refrigeração na geladeira para uso posterior nas incubações. Algumas amostras foram colocadas em álcool 96% para uso em biologia molecular.

4.2.4 Incubações

Tainha

Vinte metacercárias foram colocadas entre cada dois pedaços de filé (25 x 25 x 2-3 mm) formando “sanduíches” de músculo de peixe que foram dispostos em placas de Petri (Figura 7C-D) para incubação em diferentes temperaturas (de -20°C a 180°C) e tempos (Tabela 1).

Para cada temperatura e tempo de incubação foram feitas três réplicas de “sanduíches” de peixes com metacercárias. Nas amostras incubadas nas temperaturas de cozimento foi adicionado 1mL de soro fisiológico 0,7% às placas de Petri. Ao final do tempo de incubação dez metacercárias foram recuperadas de cada sanduíche e desencistadas sob a ação de tripsina (Sigma-Aldrich, EUA)

a 0,5% por pelo menos 30 minutos. Foram consideradas viáveis as metacercárias que desencistaram e se movimentavam ativamente. Cistos e metacercárias desencistadas após as incubações foram armazenados em AFA para posterior uso em microscopia eletrônica de varredura.

Bacalhau

Vinte metacercárias foram adicionadas com pipeta entre filés (24 x 24 x 2-3 mm) de músculo de peixe em placas de Petri para incubação em diferentes temperaturas (de -80°C a 100°C) (Tabela 1). Para cada temperatura e tempo de incubação foram feitas três réplicas de “sanduíches” de peixes com metacercárias. Nas amostras incubadas nas temperaturas de cozimento foi adicionado 1mL de água deionizada às placas de Petri.

Ao final do tempo de incubação dez metacercárias foram recuperadas de cada sanduíche e desencistadas sob a ação de tripsina (Sigma-Aldrich, EUA) a 0,25% por não mais que uma hora. Foram consideradas viáveis as metacercárias que desencistaram e se movimentavam ativamente.

As metacercárias imóveis foram coradas com ‘Trypan Blue’ (Gibco, Escócia) por pelo menos 3 minutos. As metacercárias desencistadas eram consideradas mortas quando absorviam a cor azul. O mesmo critério não pode ser usado para metacercárias que não desencistaram pois o Trypan Blue corou tanto a parede de cistos vivos como de cistos mortos e, portanto, foi necessário utilizar outros critérios para avaliar a viabilidade de metacercárias encistadas.

Também foram feitas incubações com pedaços de tecido de bacalhau (musculatura com pele medindo de 4 a 6 mm). Estas amostras foram colocadas em placas de Petri e incubadas em temperaturas selecionadas por diferentes períodos de tempo (Tabela 1). Todas as incubações foram feitas em triplicata e 1 mL de água destilada foi adicionada às temperaturas de aquecimento como o descrito acima. Após o término das incubações foi feita a digestão destas amostras como o descrito no item digestão, subitem bacalhau. A viabilidade das metacercárias recuperadas foi avaliada como o descrito acima. Este mesmo processo não foi feito com filés de tainhas contendo metacercárias de *A. (P.) longa* pois os resultados obtidos neste experimento foram praticamente os mesmos obtidos nos experimentos em que houve digestão das amostras antes das incubações.

Tabela 1: Relação de temperaturas e tempos utilizados em cada experimento, o X representa a combinação tempo e temperatura

Experimento	Temperatura °C	Tempos de incubação																				
		Minutos						Horas						Dias								
		1	5	10	15	20	30	1	2	3	4	6	12	24	2	3	4	5	6	7	8	9
A. (P.) longa	180				X		X	X														
	100				X		X	X	X													
	60				X		X	X	X													
	-10						X	X	X				X		X							
	-20						X	X	X				X		X							
	-35						X	X	X				X		X							
C. lingua	100	X	X	X	X	X																
	90	X	X	X	X	X	X															
	80	X	X	X	X	X	X															
	70		X	X	X	X	X	X														
	60		X	X	X	X	X	X	X													
	50		X	X	X	X	X	X	X	X												
	5													X		X	X	X	X	X	X	X
	-20						X	X	X	X			X	X	X							
	-40				X		X	X	X	X	X											
	-60		X	X	X	X	X	X	X													
-80	X	X	X	X	X	X																
C. lingua in situ	70		X	X	X		X		X													
	60		X	X	X	X	X	X	X													
	-20						X	X	X		X	X	X									
	-40				X		X	X	X	X												

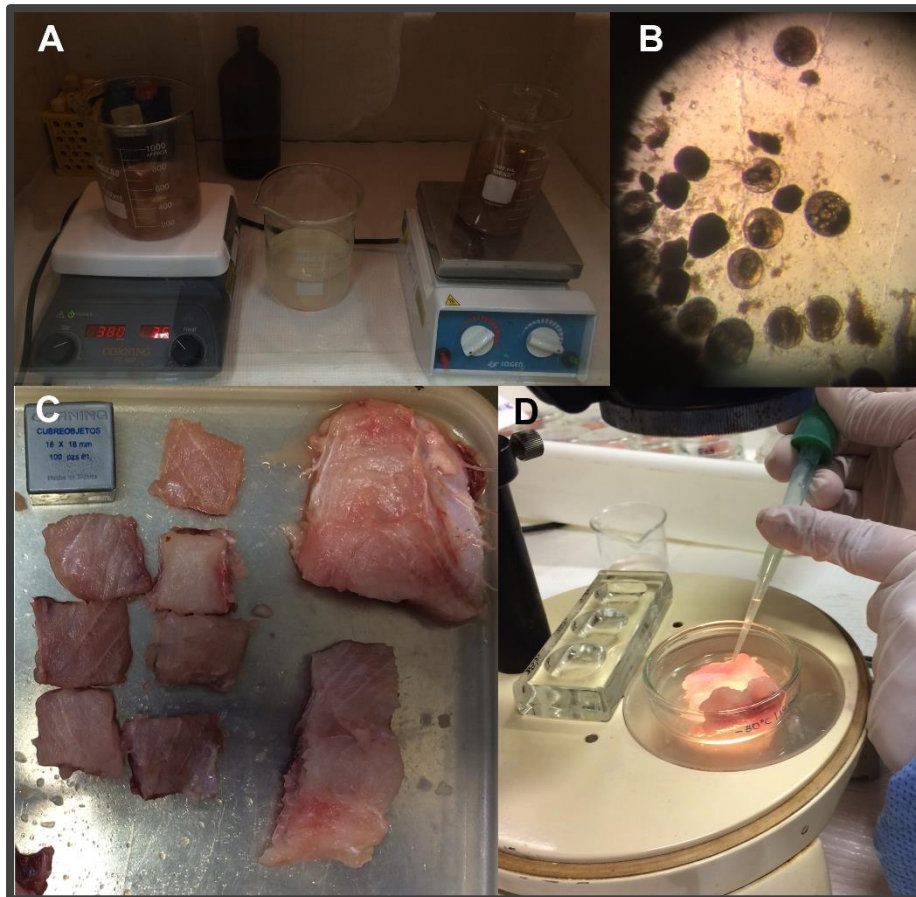


Figura 7: Procedimentos para realização da digestão e preparo dos “sanduíches” de metacercárias (A) digestão (B) metacercárias vistas em microscópio estereoscópio após a digestão (C) músculo de tainha cortado, as metacercárias não são visíveis no músculo (D) ‘pool’ de metacercárias sendo colocadas no sanduíche.

4.2.5 Identificação molecular de *Cryptocotyle lingua*

Metacercárias desencistadas e armazenadas em álcool 96% foram utilizadas para identificação molecular. O álcool foi retirado das amostras e os tubos ficaram com tampa aberta para que elas secassem completamente. Em seguida 30 µL de tampão de lise (Tween-20 0,45%, proteinase K 60µL/mL, 10mM de Tris e 1mM de EDTA) foram adicionados em cada amostra e elas foram incubadas a 55 °C até a completa lise dos parasitos (verificada ao microscópio). A desativação da proteinase K foi feita colocando as amostras a 95 °C por dez minutos.

Reações de PCR (Polymaerese Chain Reaction) foram feitas em um volume de 60 mL contendo 2 mL de DNA, 1 unidade BIOTAQ™DNA polymerase (BIOLine DNA-Technology, Dinamarca), 1 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂ e 1 mM dos oligonucleotídeos. Para amplificar a região ITS do DNA ribossomal foram utilizados os oligonucleotídeos Diplost_F3 (5'-AGGAATTCCTGGTAAGTGCAAG-3') / Diplost_R4 (5'- TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3') (Galazzo et al. 2002). Para amplificar a região mtDNA-cox1 do DNA mitocondrial os oligonucleotídeos COI2575F (5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3') / COI302 1R (5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3') (Bowles et al. 1993) foram utilizados. As reações ocorreram em um termociclador Biometra T3 (Fisher Scientific) utilizando os seguintes parâmetros: ITS - desnaturação a 94 °C por 5 min, 45 ciclos de 94 °C por 30 s, 57 °C por 30 s, 72 °C por 1 min e alongamento a 72 °C por 7 min. Para mtDNA-cox1 - desnaturação a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 50,9 °C por 30 s, 72 °C por 40 s e alongamento a 72 °C por 7 min.

Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio após eletroforese. Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit illustra™GFX™PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) e enviados através do Laboratório de Patologia Aquática da Universidade de Copenhagen para sequenciamento na Macrogen Inc. (Coréia do Sul) usando os mesmos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR.

4.2.6 Microscopia de luz

Ascocotyle (Phagicola) longa

Cinco metacercárias encistadas frescas e cinco desencistadas sob a ação de tripsina, foram montadas em lâminas com tampão fosfato salino (PBS) e sem lamínula para que não houvesse deformação dos parasitos. As lâminas foram visualizadas em microscópio de luz (Leica DMLS2) e fotografadas utilizando a câmera acoplada Moticam 10 mp e software Motic images plus v. 2.0 (Motic China Group Co.).

Cryptocotyle lingua

Dez cistos frescos foram montados em lâminas em solução fisiológica (0,9%) e dez metacercárias frescas desencistadas sob a ação de tripsina foram fixadas em formalina 4% e montadas em lâminas com PBS e sem lamínula, seguindo o protocolo utilizado na Dinamarca. As metacercárias desencistadas e encistadas foram visualizados em microscópio Leica DMLB e fotografadas com câmera Leica DC300.

4.2.7 Microscopia eletrônica de varredura

Para visualizar possíveis danos estruturais causados pela incubação de parasitos nas diferentes temperaturas foram feitas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Ascocotyle (Phagicola) longa

Os parasitos foram fixados em AFA e submetidos a três etapas de lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 por 5 min cada. A pós-fixação foi feita em uma solução de tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% durante 40 minutos. Em seguida, o material foi novamente submetido a três etapas de lavagem, com duração de 5 minutos cada, em

tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. As amostras foram desidratadas em series crescentes de etanol 30% a 90%, seguidas de 3 séries em etanol 100%, durando 1 hora cada etapa. Após a desidratação, o material foi seco pelo método do ponto crítico, utilizando CO₂ líquido, montado em suporte metálico, coberto por uma camada de ouro e observado ao microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6390 da Plataforma de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz.

Cryptocotyle lingua

Os parasitos foram fixados em glutaraldeído tamponado por PBS 2,5%. As amostras foram lavadas em PBS três vezes por dez minutos e em seguida foram desidratadas em uma série crescente de etanol 30% a 100%, e duas séries de acetona 100%. O ponto crítico foi feito em um Autosamdri-815 (A) (Tousimis, Maryland, USA) em sequência automática e em seguida as amostras foram montadas em suporte metálico cobertas por uma camada de ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6335-F, FE-SEM, Tokyo, Japão) da Universidade de Copenhagen

4.3 RESULTADOS

4.3.1 *Ascocotyle (Phagicola) longa*

O teste feito a partir da digestão da musculatura de três tainhas comprovou a presença de 514 metacercárias de *A. (P.) longa* em 308 g de filé.

Metacercárias controle, não expostas ao congelamento nem ao aquecimento, e submetidas à solução de tripsina desencistaram após meia hora de exposição, apresentando grande motilidade e sem sinais de danos externos (Figura 8 A-D). As análises por MEV revelaram muitos debris de cisto e algumas metacercárias parcialmente desencistadas (Figura 9 A-D). Nos cistos controle, com coloração translúcida, foi possível observar as metacercárias vivas e com grande motilidade (Figura 8 A, B).

As metacercárias morreram em menos de 15 minutos quando expostas a 60 °C, 100 °C e 180 °C. Nas temperaturas de congelamento, todas as metacercárias estavam mortas após duas horas de incubação a -35°C e -20°C. Foram necessárias 24 horas para matar metacercárias incubadas a -10°C. As metacercárias foram consideradas não viáveis após duas horas de exposição a todas as temperaturas (Tabela 2).

Os cistos de metacercárias consideradas mortas após a incubação apresentaram coloração marrom e não foi possível distinguir as larvas dentro deles. Estes cistos apresentaram maior resistência ao desencistamento em tripsina mesmo após 30 minutos de exposição. Os parasitos expostos a -20°C e -35°C, desencistados, apresentaram danos em seus tegumentos como a perda de espinhos em algumas regiões do corpo e fissuras (Figura 9 F, G). Cistos expostos a estas temperaturas também apresentaram danos, orifícios apareceram na superfície do cisto e em algumas partes pode-se ver que o cisto começa a “descamar” (Figura 9 E). Metacercárias expostas às temperaturas de aquecimento foram difíceis de recuperar, nas temperaturas de 100°C e 180°C, não tendo sido possível recuperar dez metacercárias em nenhuma das réplicas. Havia muitos ‘debris’ de peixe cozido e acreditamos que muitas das metacercárias possam ter desencistado e ficado muito deformadas para que pudessem ser reconhecidas. Os filés de peixe incubados a 180°C por duas horas ficaram muito duros para serem abertos e, portanto, não foram utilizados no experimento.

4.3.2 *Cryptocotyle lingua*

As sequências obtidas para as regiões ITS rDNA e mtDNA *cox-1* foram depositadas no GenBank sob os seguintes números de acesso KJ711861-KJ711866 e KJ641518-KJ641524, respectivamente. Estas foram as primeiras sequências de ITS de *C. lingua* depositadas no GenBank. As sequências obtidas para a região mtDNA *cox-1* foram idênticas entre si e obtiveram 99% de similaridade na análise BLAST feita com sequências de *C. lingua* previamente depositadas no GenBank.

Os bacalhaus estavam infectados por uma média de 561,4 metacercárias por grama de pele. A musculatura externa estava menos infectada em

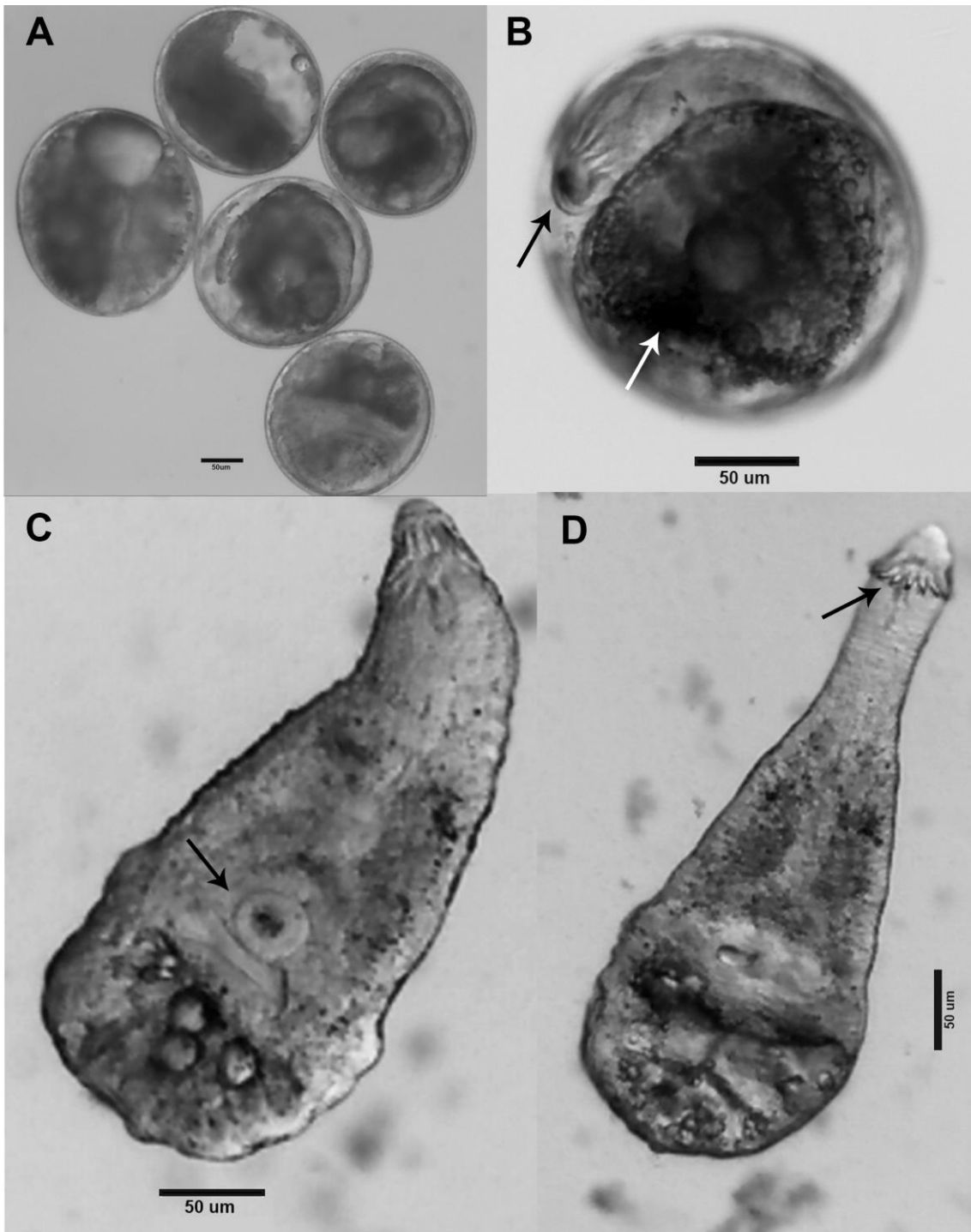


Figura 8: Metacercárias desencistadas e cistos vivos de *Ascocotyle (Phagicola) longa*. (A) cistos vivos (B) cisto com detalhe da ventosa oral (seta preta) e vesícula excretora (seta branca) (C) Metacercária desencistada com ventosa ventral em destaque (seta) (D) metacercária desencistada com espinhos da ventosa oral em destaque (seta).

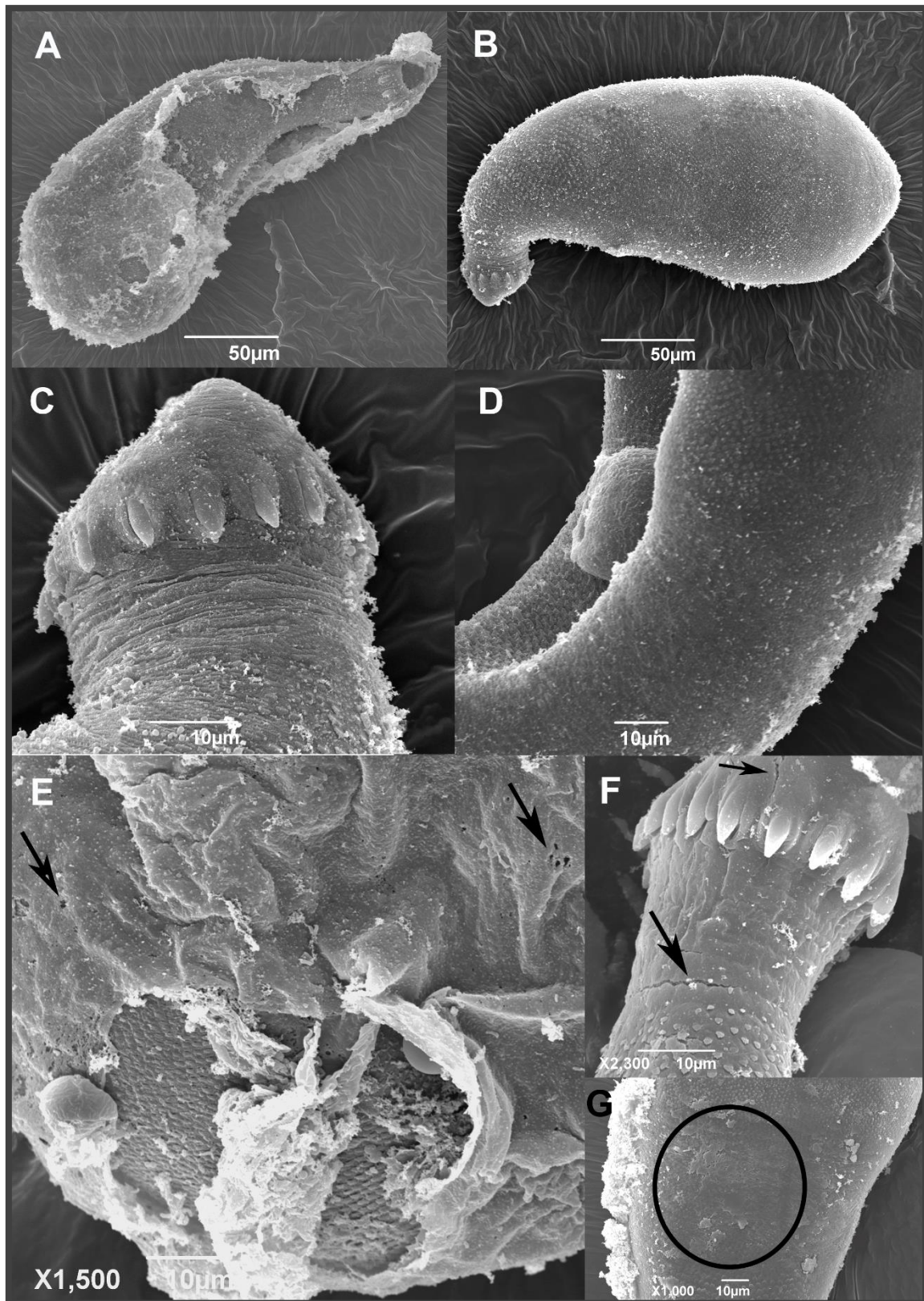


Figura 9: Microscopia eletrônica de varredura de *Ascocotyle (Phagicola) longa*. (A) metacercária controle desencistando (B) metacercária controle desencistada (C) detalhe da região anterior de uma metacercária controle (D) detalhe do tegumento com espinhos e ventosa ventral em uma metacercária controle (E) cisto exposto a -35°C por 24 horas, as setas indicam orifícios no cisto (F) metacercária exposta a -20°C por 30 minutos, as setas indicam fissuras no tegumento (G) metacercária exposta a -20°C por 30 minutos, o círculo indica uma região em que houve perda de espinhos.

Tabela 2: Porcentagem de metacercárias de *A. (P.) longa* mortas para cada tempo de incubação e temperatura (resultados baseados nas médias das três réplicas, cada uma contendo dez metacercárias). A cor vermelha indica que todas as metacercárias foram consideradas inviáveis.

Temperatura °C	Tempo de incubação					
	Minutos		Horas			
	15	30	1	2	24	48
180	100%*	100%*	100%*	**	-	-
100	100%*	100%*	100%*	100%*	-	-
60	100%	100%	100%	100%*	-	-
-10	-	33%	47%	90%	100%	100%
-20	-	33%	67%	100%	100%	100%
-35	-	63%	70%%	100%	100%	100%

- Tempos não testados para estas temperaturas

* O total de metacercárias recuperados na incubação foi menor do que dez.

** não foi possível utilizar as amostras pois o peixe estava muito cozido.

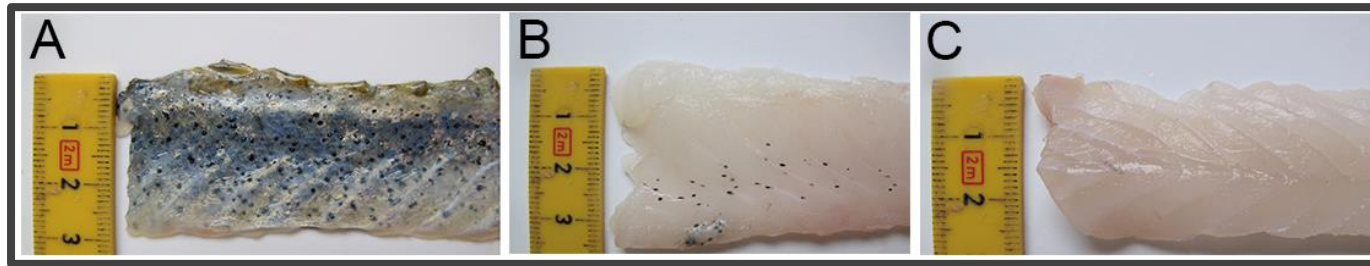


Figura 10: Metacercárias de *Cryptocotyle lingua* encistadas na pele e músculo de bacalhau. (A) Pele apresentando diversos cistos (B) Músculo externo apresentando alguns cistos (C) Músculo interno sem cistos. A escala é dada em centímetros (cm).

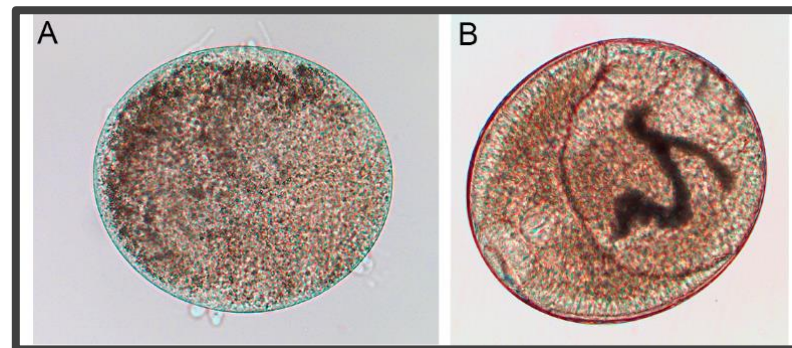


Figura 11: Metacercárias encistadas de *Cryptocotyle lingua*. (A) Metacercária morta (considerada não viável após incubação a -20°C por 2 h) apresentando perda de características morfológicas. (B) Metacercária viva encistada apresentando ventosa oral, faringe e vesícula excretora.

comparação com a pele, ela apresentou uma média de 2,4 metacercárias por grama de músculo. Nenhuma metacercária foi encontrada na camada interna da musculatura (Figura 10).

Metacercárias não expostas a temperaturas de congelamento e aquecimento desencistaram rapidamente e permaneceram viáveis mesmo após uma hora de incubação em solução de tripsina. As metacercárias encistadas foram consideradas mortas quando houve mudança na coloração de translúcida para marrom opaco, com dificuldade para visualizar a metacercária dentro do cisto (Figura 11).

Metacercárias morreram em menos de 20 minutos quando expostas a 70°C, 80°C, 90°C e 100°C enquanto foram necessárias duas horas a 50°C para mata-las. Nas temperaturas de congelamento, todas as metacercárias estavam mortas após 20 min a -80°C, porém foram necessárias duas horas para matar metacercárias incubadas a -20°C, -40°C e -60°C. As metacercárias foram consideradas não viáveis após duas horas de exposição a todas as temperaturas. Isso foi verificado em ambos os experimentos, tanto nas incubações com metacercárias colocadas em sanduíches como nas incubações de tecido de peixe naturalmente infectado. Controles mantidos a 5°C sobreviveram por mais de nove dias (Tabela 3 a e b).

A temperatura de congelamento de -80°C não causou nenhum dano visual à parede dos cistos das metacercárias mesmo após 30 min de exposição quando todas as metacercárias estavam mortas (Figura 12 A). Os cistos de metacercárias expostas a -20°C por 30 min apresentaram orifícios, rachaduras e começaram a “descamar” (Figura 12 B). O mesmo tipo de dano foi observado em cistos expostos a 70°C por cinco minutos e uma hora (Figura 12 C, D). Estes danos podem ter sido exacerbados pela técnica de preparação das amostras para a microscopia eletrônica. Metacercárias expostas a -80°C por um minuto e desencistadas em seguida, apresentaram tegumento sem danos (Figura 12 H) enquanto metacercárias expostas por 30 minutos à mesma temperatura perderam a maioria das características morfológicas (Figura 12 E, G). O mesmo tipo de dano no tegumento foi observado em metacercárias expostas a -20°C por uma hora (Figura 12 F). As imagens de microscopia eletrônica de cistos expostos a 70°C evidenciam o tegumento danificado e perda de espinhos das metacercárias dentro dos cistos (Figura 12 C, D)

Tabela 3: Porcentagem de metacercárias de *C. lingua* mortas em diferentes tempos e temperaturas de incubação. A cor vermelha indica morte de todas as metacercárias. (2a) Metacercárias foram isoladas por digestão em pepsina antes da incubação. (2b) Metacercárias foram incubadas no tecido do peixe (in situ) e depois isoladas por digestão com tripsina.

3a

Temperatura °C	Tempos de incubação																					
	Minutos						Horas								Dias							
	1	5	10	15	20	30	1	2	3	4	6	12	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100	0	30%	100%	100%	100%																	
90	0	30%	20%	100%	100%	100%																
80	0	0	53%	100%	100%	100%																
70	-	0	70%	100%	100%	100%	100%															
60	-	0	0	0	0	100%	100%	100%														
50	-	0	0	0	0	0	0	100%	100%													
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	37%	80%	83%	90%	100%
-20	-	-	-	-	-	0	87%	100%	100%	-	-	100%	100%	100%								
-40	-	-	-	30%	-	40%	100%	100%	100%	100%												
-60	-	0	0	0	25%	100%	100%	100%														
-80	0	0	0	93%	100%	100%																

3b

Temperatura °C	Tempo de incubação													
	Minutos						Horas							
	1	5	10	15	20	30	1	2	3	4	6	12	24	
70	-	0	10%	90%	-	100%	-	100%						
60	-	0	0	37%	3.7	100%	100%	100%						
-20	-	-	-	-	-	0	83%	97%	-	-	100%	100%	100%	
-40	-	-	-	0	-	43%	100%	100%	100%					

- Tempos não testados para estas temperaturas

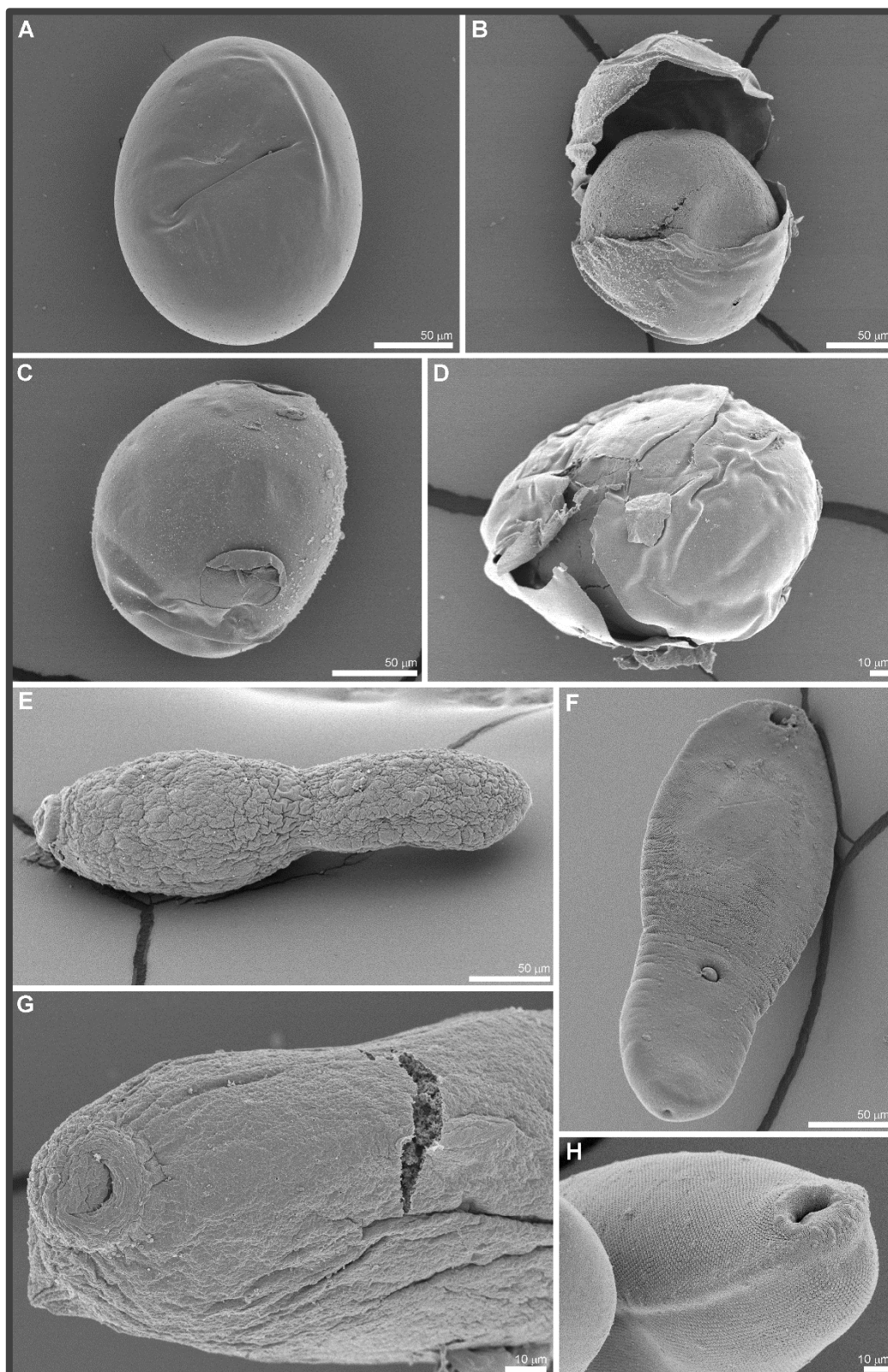


Figura 12: Microscopia Eletrônica de Varredura de *Cryptocotyle lingua* exposto a temperaturas de congelamento e aquecimento. (A) Cisto exposto a -80°C por 30 min. (B) Cisto exposto a -20°C por 30 min. (C) Cisto exposto a 70°C por 5 min. (D) Cisto exposto a 70°C por 1 h (E) e (G) Metacercária desencistada exposta a -80°C por 30 min. (F) Metacercária desencistada exposta a -20°C por 1 h. (H) Metacercária desencistada exposta a -80°C por 1 min.

4.4 DISCUSSÃO

Neste estudo foi testada a viabilidade de metacercárias de *Ascocotyle (Phagicola) longa* e *Cryptocotyle lingua* expostas a temperaturas de congelamento e aquecimento. Foi possível comprovar que uma exposição de duas horas a todas as temperaturas, exceto -10°C, são suficientes para inviabilizar 100% das metacercárias.

As temperaturas de congelamento foram escolhidas por sua relevância no caso das incubações de *A. (P.) longa*, sendo -20°C e -35°C, temperaturas citadas em documentos oficiais como sendo utilizadas no congelamento de pescado (EFSA 2010). A temperatura de -10°C é a que o freezer comum de geladeiras residenciais pode atingir. Com relação às temperaturas de cozimento, 180°C é a temperatura mínima atingida pelo forno comum e 100°C a temperatura de cozimento padrão em fogões a gás. A temperatura 60°C foi incluída por se tratar da temperatura máxima utilizada na técnica de defumação a frio (EFSA 2010).

O órgão americano de controle da qualidade de alimentos, FDA, destaca diversos fatores que afetam a eficiência da conservação de pescado congelado, dentre os mais importantes estão: espécie do parasito, quantidade de gordura e espessura do filé de peixe (FDA 2011). Em estudos realizados com metacercárias de *Clonorchis sinensis* Looss, 1907 e *Heterophyes* sp. foi relatado que estas espécies poderiam resistir de 33h a sete dias à temperatura de -20°C (Fan, 1998; Hamed e Elias, 1970). Neste estudo, duas horas de incubação à mesma temperatura foram suficientes para inviabilizar metacercárias de *A. (P.) longa* e *C. lingua*. Segundo Moraes (2005) Metacercárias de *A. (P.) longa* estariam viáveis mesmo após 24 horas de exposição a uma temperatura de -16°C. Esses resultados diferem dos obtidos em nossos estudos onde 24 horas de exposição a uma temperatura de -10°C foram suficientes para inativar 100% das metacercárias de *A. (P.) longa*. Essas diferenças podem estar relacionadas tanto à espessura dos filés utilizados (em nosso estudo eles foram bastante finos, 2-3 mm) quanto à uma diferença na tolerância a temperaturas de congelamento para cada espécie. Em nossos experimentos optamos por usar filés finos para melhor avaliar a tolerância das metacercárias às temperaturas testadas, porém estudos levando em conta diferentes espessuras de filés de

peixe são interessantes para avaliar a influência deste parâmetro na resistência de metacercárias ao congelamento e aquecimento.

Em estudos com metacercárias de *A. (P.) longa* utilizando tratamento de filés de tainha por radiação ionizante, Moraes (2005) observou que 100% das metacercárias foram inativadas ao serem expostas a doses a partir de 1K Gy e que a irradiação com feixes de elétrons seria mais eficiente que aquelas que utilizam raios gama. Estes resultados representam uma alternativa de tratamento para a indústria do pescado quando seus produtos forem destinados ao consumo cru ou mal cozido, já que o congelamento muitas vezes pode descaracterizar a consistência do filé. Porém esse método dificilmente será utilizado em peixes provenientes de pesca artesanal ou vendidos em feiras livres, sendo o congelamento o processo mais recomendado nestes casos.

As metacercárias de *A. (P.) longa* parecem ser mais sensíveis a altas temperaturas uma vez que 100% das metacercárias expostas a estas temperaturas ficaram inviáveis em apenas 15 minutos. Rodrigues et al. (2015) relataram que metacercárias de *A. (P.) longa* foram inativadas com dois a três minutos de cozimento a uma temperatura de 50°C a 56°C em filés de tainha, o que condiz com os resultados encontrados em nosso estudo. Nas incubações feitas com *C. lingua* na mesma temperatura, metacercárias começaram a morrer apenas após 30 minutos de exposição. Em estudos feitos com *Clonorchis sinensis* e *Opisthorchis viverrini* (Poirier, 1886), metacercárias expostas a 80°C foram inativadas com 5 e 12 minutos de exposição respectivamente (Cho et al. 2002, Prasongwatana et al. 2012). Já Hamed e Elias (1970) encontraram metacercárias de *Heterophyes* sp. ainda ativas em peixes expostos à temperatura de 100 °C por dez minutos.

Estas diferenças na sensibilidade de metacercárias à temperatura de cozimento podem estar relacionadas tanto à uma tolerância específica quanto à presença ou ausência de água nos experimentos. Em nossos experimentos com *A. (P.) longa* e *C. lingua* 1 mL de água foi adicionada às incubações e foi observado que a água parece ter agido como um condutor do calor, uma vez que em incubações piloto (incubações teste feitas antes do experimento oficial) feitas com *C. lingua* à 70 °C e sem a adição de água, metacercárias foram encontradas vivas mesmo após uma hora de incubação. No trabalho de Hamed e Elias (1970), os peixes foram expostos diretamente ao fogo e, portanto, a

temperatura atingida no interior do peixe pode não ter alcançado 100 °C; a adição de água ao cozimento poderia ter ajudado para que isso acontecesse. Os demais trabalhos não especificaram a maneira em que o pescado foi incubado, por isso não podemos dizer se houve condução de calor pela água ou não.

Embora existam leis que regulamentem o tratamento prévio por congelamento de pescado cru ou mal cozido destinado ao consumo na Europa e Estados Unidos, não existem normas específicas de conduta no Brasil (EFSA 2004, EFSA 2010, FDA 2011). O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA - BRASIL, 1952) considera o aspecto repugnante e a presença maciça de parasitos na musculatura condições que tornam o pescado impróprio para consumo, porém cistos de trematódeos nem sempre são macroscópicos como é o caso de *A. (P.) longa* em que não é possível ver os cistos encistados na musculatura de tainhas a olho nú. Este mesmo documento estabelece condições de acondicionamento para transporte de pescado em ambientes refrigerados, mas não há uma recomendação de tratamento para a inativação de parasitos especificamente. Em 2005 a ANVISA emitiu uma nota de esclarecimento sobre a ocorrência de difilobotríase no estado de São Paulo em que recomendava que pratos preparados ou que contivessem peixe cru ou mal cozido deveriam ser precedidos de congelamento do pescado em pelo menos -20°C por um período mínimo de sete dias ou -35°C por um período de no mínimo 15 horas, porém não existe uma lei que regule este procedimento.

A legislação europeia determina que o pescado e seus produtos devem ser congelados a uma temperatura não maior do que -20°C, em todas as partes do produto por pelo menos 24 horas (EFSA 2004). Este procedimento é recomendado para alguns peixes que sejam destinados ao consumo crus ou quase crus, assim como para algumas espécies de peixe que passem pelo processo de defumação a frio, abaixo de 60 °C (Beldsoe e Oria 2001, EFSA 2004, 2010). Apesar do congelamento a -20°C por 24 horas ser suficiente para inativar metacercárias de *C. lingua*, o bacalhau não aparece na lista de espécies que devem ser congelados antes de passarem pela defumação a frio (EFSA 2010). Baseados nos resultados obtidos em nosso estudo, é altamente recomendável que a indústria congele o bacalhau antes de passar por processos de defumação a frio.

As metacercárias de *C. lingua* incubadas em temperaturas de aquecimento e expostas à tripsina apresentaram mais dificuldade para desencistar. Este mesmo padrão foi observado nas metacercárias *A. (P.) longa*, contudo, nas metacercárias de *A. (P.) longa* o desencistamento em tripsina apresentou uma resistência maior do *C. lingua*, mesmo no grupo controle. Os cistos de *A. (P.) longa* pareciam mais aderentes e mesmo depois de desencistadas as metacercárias pareciam ficar grudadas em parte do cisto, o que também foi evidenciado pela microscopia eletrônica de varredura onde é possível ver muitos debris de cistos. Esta maior aderência dos cistos de *A. (P.) longa* pode ocorrer por diferenças na composição dos cistos das duas espécies.

Apesar de não apresentarem grandes diferenças com relação ao tempo de resistência das metacercárias expostas às diferentes temperaturas, os danos externos apresentados pelas metacercárias causados pelas incubações parecem ter afetado mais severamente *C. lingua* do que *A. (P.) longa*. Enquanto *C. lingua* apresentou uma perda extensiva de espinhos e tegumento enrugado, as imagens de microscopia eletrônica mostraram algumas alterações pequenas no tegumento de metacercárias de *A. (P.) longa* com uma pequena perda de espinhos e algumas fissuras. Embora algumas destas alterações possam ter sido causadas, em parte, pelo processo de preparação das amostras para a microscopia eletrônica acreditamos que se os cistos e metacercárias desencistadas já não estivessem enfraquecidos, estes danos não ocorreriam.

De acordo com os resultados de nosso trabalho é altamente recomendável que o governo brasileiro regulamente procedimentos para a inativação de parasitos presentes no pescado quando estes produtos forem destinados ao consumo humano de peixe cru ou mal cozido. No caso de *C. lingua*, a recomendação é que o bacalhau seja congelado antes de ser submetido ao processo de defumação a frio.

Parte deste capítulo compõe o **Anexo 1**. Borges JN, Skov J, Bahloul QZM, MØller OS, Kania PW, Santos CP, Buchmann K. Viability of *Cryptocotyle lingua* metacercariae from Atlantic cod (*Gadus morhua*) after exposure to freezing and heating in the temperature range from -80°C to 100°C. Food Control 2015; 50: 371-377.

5 Capítulo 2:

Caracterização genética de Trematoda Heterophyidae de peixes da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro

5.1 INTRODUÇÃO

Os Digenea são considerados o grupo de parasitos com maior diversidade dentro do Filo Platyhelminthes (Olson e Tkach 2005). Esta diversidade inclui diferentes fases larvais e variados ciclos de vida, que são objeto de estudo de parasitologistas desde o século XVIII, gerando dificuldades nos estudos taxonômicos das espécies (La Rue 1957, Odening 1974, O'Grady 1985; Rhode 1990; Cribb et al. 2003). Neste contexto, estudos moleculares vêm contribuindo para melhor elucidar a taxonomia e sistemática de Digenea nos últimos trinta anos (Blair et al. 1996; Tkach et al. 2000; Olson et al. 2003; Olson e Tkach 2005).

O maior trabalho realizado para entender as relações dentro de Digenea com ferramentas moleculares foi feito por Olson et al. (2003), onde 163 espécies representando 77 famílias foram estudadas utilizando-se uma análise combinada das regiões 18S e 28S do DNA ribossomal. Contudo apesar de gerar uma grande clareza com relação aos grandes táxons de Digenea, ainda há questões a serem respondidas com relação à separação de diversas famílias (Olson et al. 2003, Olson e Tkach 2005).

Heterophyidae, Opisthorchiidae e Cryptogonimidae são três famílias que compõem a superfamília Opisthorchioidea. Estas três famílias possuem características morfológicas e ciclos de vida muito parecidos em que há a presença de dois hospedeiros intermediários, sendo o segundo hospedeiro intermediário um peixe e mamíferos e aves como hospedeiros definitivos (Cribb et al. 2003). Dentre os estudos moleculares envolvendo as três famílias, tem sido evidenciado que Heterophyidae e Opisthorchiidae compõem um grupo parafilético (Olson et al. 2003; Thaenkham et al. 2011b; Thaenkham et al. 2012).

Muitos estudos têm se utilizado de marcadores genéticos clássicos para elucidar questões taxonômicas dentro da família Heterophyidae, porém estudos utilizando diversos marcadores e relatando a variabilidade intraespecífica de espécies desta família ainda são escassos (Dung et al. 2013, Pornruseetairatn

et al. 2015). Conhecer a estrutura genética de populações de parasitos pode contribuir para o entendimento da dinâmica evolutiva e para o controle de parasitoses (Brusentsov et al 2013). Desta forma estudos genéticos de parasitos Heterophyidae e Opisthorchiidae também são de grande importância, uma vez que espécies de ambas as famílias apresentam potencial zoonótico (Tarascewski 1984, Fried et al. 2004, Chai et al. 2005, Clausen et al. 2015).

Apesar dos grandes avanços proporcionados, dados moleculares sozinhos não fornecem resultados com alto grau de resolução, o que torna necessário o uso de características morfológicas, ecológicas e do ciclo de vida para obter filogenias e classificações mais confiáveis (Cribb et al. 2003; Olson & Tkach, 2005).

Estudos ultraestruturais dos sistemas muscular e nervoso de helmintos são importantes, uma vez que estes sistemas interagem de maneira altamente coordenada para controlar movimentos associados à alimentação, locomoção e fixação destes parasitos (Maule et al. 2005). Estudos de microscopia de varredura a laser confocal (MVLC) usando técnicas de imunocitoquímica também vêm sendo utilizados para caracterizar o circuito neuronal e ontogenia do sistema nervoso de organismos muito pequenos e a estrutura muscular de trematódeos (Fairweather e Skuce 1995). Estudos envolvendo citoquímica do sistema nervoso de trematódeos também têm sido usados para detectar serotonina (Halton e Gustafsson 1996, Magee et al. 1989, Stewart et al. 2003), assim como a citoquímica direta usando faloidina vêm sendo utilizada para detectar α -actina nas fibras musculares (Santos et al. 2013). Estas técnicas já foram utilizadas em *Schistosoma mansoni* (Mair et al. 2000, Day et al. 1994), *Fasciola hepatica* (Stitt et al. 1992; Magee et al. 1989) e *Diplostomum pseudospathaceum* (Czubaj e Niewiadomska 1997). Até o momento há estudos ultraestruturais da musculatura apenas uma espécie de heterofiídeo, *A. (P.) longa* (Santos et al. 2013).

A Lagoa Rodrigo de Freitas, no Rio de Janeiro, constitui um ambiente propício para a ocorrência de ciclos de heterofiídeos pois nela coabitam os diferentes hospedeiros que abrigam estes parasitos. Dentre as espécies de heterofiídeos encontrados em peixes da Lagoa Rodrigo de Freitas estão *Ascocotyle (Phagicola) longa* Ransom, 1920, *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* (Travassos, 1928) e *Pygidiopsis macrostomum* Travassos, 1928.

Embora o ciclo de vida e a caracterização morfológica destas espécies já tenham sido elucidados, ainda não foi feita uma caracterização genética das populações destes parasitos (Simões et al. 2005, 2006, 2009, 2010; Santos et al. 2013).

Neste capítulo serão apresentadas as caracterizações genéticas de *P. macrostomum*, *A. (P.) pindoramensis* e *A. (P.) longa* utilizando-se três marcadores nucleares (18S, 28S e ITS2 rDNA) e um marcador mitocondrial (mtDNA *cox-1*). Uma análise da variação intra e interespecífica é reportada e discutida utilizando-se as regiões gênicas ITS2 rDNA e mtDNA *cox-1* para as três espécies e uma análise filogenética incluindo membros de Heterophyidae e Opisthorchiidae é também apresentada. Além disso um estudo da ultraestrutura de *P. macrostomum* utilizando técnicas imunocitoquímicas é apresentado.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Coleta de peixes e Infecções experimentais

Os peixes *Poecilia vivipara* (barrigudinhos) e *Mugil liza* (tainhas) foram coletados na Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil (22°57'02"S, 43°11'09"W) com a colaboração dos pescadores da colônia Z13, de fevereiro de 2013 a fevereiro de 2015. Esta coleta foi aprovada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, licença no. 15898-1). Os peixes foram trazidos ao laboratório, sendo que *P. vivipara* foram mantidos vivos em aquários até o momento de uso. Alguns *P. vivipara* foram dissecados e metacercárias de *P. macrostomum* foram coletadas no mesentério, isoladas em soro fisiológico (0,7%) e desencistadas mecanicamente para serem estudadas por microscopia de varredura a laser confocal. No total foram realizadas seis infecções experimentais utilizando hamster *Mesocricetus auratus*. Estes procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA- Fiocruz no. L-020/2015) e está de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Durante as infecções, cada hamster foi alimentado por três dias consecutivos com apenas um tipo de alimento sendo: fígado, baço, coração, intestino ou músculo de *M. liza* para obtenção de *A. (P.) longa* e com mesentério de *P. vivipara* para obtenção de *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum*. No

quarto dia pós-infecção os hamsters foram eutanasiados em câmara de CO₂, os intestinos foram retirados e colocados em placas de Petri com soro fisiológico 0,7% para serem analisados à procura de parasitos com o auxílio de microscópio estereoscópico (Leica zoom 2000, Olympus SZ61). Os parasitos coletados foram identificados de acordo com Simões et al. (2005, 2006) e Simões (2005), e fixados em álcool 90% para uso posterior.

5.2.2 Extração de DNA

Os parasitos foram alocados individualmente em tubos de 1,5 µL e lavados em água destilada. Para extração do DNA genômico foi utilizado o protocolo descrito por Billings et al. (1998) com algumas modificações, como descrito a seguir. Foram adicionados 200 µL de tampão de lise (NaCl 0,1M; TRIS-HCl 0,21M pH 8,0; EDTA 0,05M e SDS 0,5%) ao tubo contendo os parasitos e ele foi incubado por 30 minutos a 37 °C. Após a incubação foram adicionados 20 µL de Proteinase K (Promega, EUA) às amostras e em seguida elas foram novamente incubadas “overnight” a 55 °C. Após a segunda incubação foram adicionados 200 µL de fenol às amostras e foi feita agitação por inversão durante cinco minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por dois minutos; o sobrenadante foi retirado e colocado em novo tubo de 1,5 mL e o restante da solução foi descartado. Foram adicionados 100 µL de fenol e 100 µL de Clorofórmio às amostras e foi feita agitação por inversão durante cinco minutos. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por dois minutos, o sobrenadante foi retirado e colocado em novo tubo e o resíduo descartado. Uma última etapa com lavagem das amostras com 200 µL de Clorofórmio foi feita. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por dois minutos, o sobrenadante foi transferido para novo tubo e o restante desprezado. Foram acrescentados 400 µL de álcool 100% às amostras e em seguida elas foram incubadas “overnight” a -20°C. Após a precipitação do DNA as amostras foram retiradas do freezer e centrifugadas a 14000 rpm por dez minutos. Descartou-se o sobrenadante, o “pellet” foi lavado com 400 µL de álcool 70% e foi feita homogeneização por inversão. Após a lavagem as amostras foram centrifugadas novamente a 14000 rpm por dez minutos. O álcool foi descartado

e o “pellet” foi deixado para secar por 30 minutos. O DNA foi ressuspensionado em 30 µL de água ultrapura.

Alternativamente foi utilizado também nas extrações o protocolo do produto InstaGene Matrix (Bio-Rad, EUA) onde os parasitos foram lavados três vezes em água ultrapura e em seguida individualizados em tubos de 1,5 mL. A solução do InstaGene foi homogeneizada em velocidade moderada e em seguida 100 µL foram adicionados em cada tubo. As amostras foram então incubadas a 56 °C por 30 minutos. Após a incubação as amostras foram misturadas no vórtex em alta velocidade por dez segundos e novamente incubadas a 100 °C por oito minutos. Em seguida as amostras foram misturadas em vórtex por dez segundos, centrifugadas a 12000 rpm por três minutos e armazenadas a -20°C até uso posterior.

5.2.3 Reações em cadeia da polimerase (PCR)

As reações em cadeia da polimerase foram realizadas para quatro regiões gênicas: subunidade menor do ribossomo (18S rDNA), subunidade maior do ribossomo (28S rDNA), espaçador transcrito interno 2 do DNA ribossomal (ITS2 rDNA) e Citocromo Oxidase I do DNA mitocondrial (mtDNA *cox-1*). Todas as reações feitas tiveram volume final de 15 µL sendo 7,5 µL de GOtaq2 Mastermix (Promega, Madison, WI - USA), 1,5 µL de cada oligonucleotídeo (na concentração final de 1 pmol), 0,5 µL de MgCl₂ (na concentração final de 1,6 mM), 1,5 µL de água ultrapura e 2,5 µL de DNA.

Na PCR para região gênica 18S rDNA foram utilizados os oligonucleotídeos Het 18S F (5'–TCATATGCTTGTCTCAGA–3') e Het 18S R (5'–ACGGAAACCTTGTTACGA–3') desenhados por Dzikowski et al. (2004). As amostras foram colocadas em termociclador (Mastercycler Personal - Eppendorf/) e submetidas às seguintes condições de amplificação: Pré-aquecimento 95 °C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 53 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos e um ciclo final de 72 °C por 7 minutos. Para a mesma região gênica foram também utilizados os oligonucleotídeos iniciadores Uni 18S F (GCTTGTCTCAGAGATTAAGCC) e Uni 18S R (ACGGAAACCTTGTTACGAC) desenhados por Levy et al. (2002) e as amostras foram submetidas às seguintes condições no termociclador: pré-

aquecimento a 95 °C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos e um ciclo final de 72 °C por 7 minutos. Para a região gênica 28S rDNA foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores LSU5 (TAGGTTCGACCCGCTGAAYTTAAGCA) e 1500R (GCTATCCTGAGGGAACTTCG) desenhados por Tkach et al. (2003), com as amostras submetidas ao seguinte ciclo: pré-aquecimento 94 °C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 52 °C por 30 segundos, 72 °C por 2 minutos e um ciclo final de 72 °C por 7 minutos. Para a região gênica ITS2 rDNA foram utilizados os oligonucleotídeos OPHEF F (CTCGGCTCGTGTGTCGATGA) e OPHEF R (GCATGCARTTCAGCGGGTA) desenhados por Skov et al. (2009) sob as seguintes condições em termociclador: pré-aquecimento 94 °C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto e um ciclo final de 72 °C por 5 minutos. Para a região gênica mtDNA *cox-1* foram utilizados os oligonucleotídeos JB3 (TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT) e JB4.5 (AATCATGATGCAAAAGGTA) desenhados por Bowles et al. (1993), com as amostras submetidas ao seguinte ciclo: pré-aquecimento 95 °C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos e um ciclo final de 72 °C por 7 minutos.

5.2.4 Eletroforese e purificação dos produtos amplificados pela PCR

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1,5 % corado com SYBERGREEN 10000X (PROMEGA, EUA). Foram utilizados 5 µL de peso molecular (PROMEGA, EUA) 9 µL de produto da PCR com 1 µL de corante em cada poço, sendo submetidas à eletroforese em tampão de corrida TBE 0,5X sob uma corrente de 90V e posteriormente visualizados no transiluminador sob luz ultravioleta. Os resultados da PCR foram registrados fotograficamente com câmera fotográfica (Sony Cybershot DSC-W180). Na purificação das amostras adicionou-se 2 µL de EXOSAP-IT (Affymetrix, EUA) ao restante do produto da PCR, levando as amostras ao termociclador sob as seguintes condições: aquecimento de 37 °C por 25 minutos seguido de 80 °C por 15 minutos.

5.2.5 Determinação das sequências nucleotídicas

As amostras purificadas foram encaminhadas para a reação de sequenciamento nucleotídico com o conjunto de diagnóstico ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems-Perkin Elmer, EUA) de acordo com o protocolo utilizado pela plataforma de sequenciamento. Na reação de sequenciamento foram utilizados 1,5 µL de Big Dye, 1,25 µL de tampão, oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 1 pmol/µL, 2,5 µL de produto da PCR purificado e água para completar a reação para o volume final de 10 µL. A reação foi submetida ao mesmo ciclo de sequenciamento e depois sequenciadas em ambas as fitas com o uso do sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems-Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA) da plataforma PDTIS-Fiocruz.

5.2.6 Análise computacional das sequências nucleotídicas

As sequências foram obtidas em forma de cromatogramas e analisadas no programa MEGA versão 5.0 (Tamura et al., 2011). Assim, durante a edição das sequências foram verificadas possíveis ambiguidades em decorrência de erros de leitura do sequenciamento. As sequências nucleotídicas consenso editadas foram alinhadas pelo algoritmo CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) inserido no pacote do programa MEGA. Para a análise de similaridade foi utilizado o servidor BLAST 2.0 (“Basic Local Alignment Search Tool”) (Altschul et al., 1990) do ‘National Center for Biotechnology Information’ (NCBI) da Biblioteca Nacional de Medicina do NIH (‘National Institute of Health’), Maryland, EUA (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

As sequências de DNA de membros da família Heterophyidae para as regiões do 18S rDNA, 28S rDNA, ITS2 rDNA e mtDNA *cox-1*, previamente depositadas no GenBank, cujos números de acesso são apresentados no anexo IV deste trabalho, foram alinhadas com as sequências obtidas neste estudo. As distâncias genéticas entre as sequências alinhadas foram calculadas no software MEGA utilizando-se o parâmetro distância p. O alinhamento das sequências deste estudo com as sequências depositadas no GenBank serviu como base para a construção de árvores filogenéticas, utilizando o software

MEGA, sendo que os modelos evolutivos utilizados em cada reconstrução filogenética foram escolhidos através do software jModel test (Posada 2008). Para a região genética 18S rDNA foi utilizado o modelo Tamura-Nei (TN93) com distribuição gama, para as regiões genéticas 28S e ITS rDNA o modelo escolhido foi o 'General Time Reversible' (GTR) com distribuição gama e 'sites' invariáveis. Para a região do mtDNA *cox-1*, o modelo evolutivo escolhido foi o Hasegawa-Kishino-Yano com distribuição gama e 'sites' invariáveis. As árvores filogenéticas foram construídas empregando o algoritmo de 'Maximum Likelihood' (ML) (Felsenstein 1981). Para cada construção, a veracidade dos ramos foi conferida por análise de 'bootstrap' (1000 repetições).

5.2.7 Microscopia de Varredura a Laser Confocal

Para as análises de microscopia de varredura a laser confocal (MVLC), metacercárias e adultos foram fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M pH 7,4 por cinco horas e então lavados em PBS três vezes por dez minutos. Os parasitos foram transferidos para o Triton X-100 tamponado em PBS 0,5% e lavados três vezes. Em seguida os parasitos foram lavados por duas vezes em PBS, cada lavagem com duração de dez minutos. Para a visualização das fibras musculares os parasitos foram incubados em faloidina conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) 1:350 ou isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (Sigma, EUA) 1:700 em PBS 'overnight' a 6°C. As amostras foram lavadas em PBS três vezes por dez minutos, lavadas novamente em NaCl 0,85% por dez minutos e então montados em lâminas com 2,5% 1,4-diazabicio-(222)-octano trietilenodiamina (DABCO) e 50% glicerol pH 7,2 (Sigma, EUA).

Para a técnica de imunofluorescência indireta que teve como objetivo detectar locais com serotonina nos tecidos neuronais, as amostras foram lavadas por 15 minutos em solução com anticorpos (0,1M PBS pH7,4, 0,1% Triton X-100, 4% soro albumina bovina) e então incubadas por dois dias em anticorpo primário anti-serotonina 1:100 ou 5-HT produzido em coelhos (Sigma, EUA). Os espécimes foram então lavados em diluente de anticorpo e incubados por um dia em anticorpo secundário, anticorpo de coelho anti- imunoglobulina G (IgG) de cabra, conjugado com FITC (adaptado de Stewart et al., 2003). Os

parasitos foram lavados novamente em diluente de anticorpo em PBS fresco e montados em lâminas com DABCO. Os controles empregados foram: (1) omissão de faloidina; e (2) omissão de anticorpo primário. Observações foram feitas em um microscópio de varredura a laser confocal Leica (CLSM Axiovert 510, META, Zeiss, Germany).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Microscopia confocal de *Pygidiopsis macrostomum*

O tegumento de *Pygidiopsis macrostomum* adulto é coberto por pequenos espinhos (Figura 13 A-B). A musculatura foi visualizada por marcação com faloidina, evidenciando as fibras longitudinais, diagonais, circulares e radiais (Figura 13 C). A camada mais superficial do tegumento é coberta por fibras diagonais cruzadas que vão diminuindo a distância entre si nas extremidades do parasito. Fibras circulares perpendiculares ao eixo longitudinal do corpo foram observadas na camada interna do tegumento (Figura 13 C). A ventosa oral é muscular e sem espinhos, formada por fibras longitudinais cruzadas por fibras circulares muito próximas entre si (Figura 13 A-C). A pré-faringe é curta e formada por fibras longitudinais (Figura 13 D). A faringe muscular tem o arranjo de fibras semelhante ao das ventosas (Figura 13 B, D). O esôfago é formado por fibras longitudinais, cruzadas por fibras circulares. Fibras longitudinais foram bem marcadas nas paredes dos cecos intestinais (Figura 13 E). Fibras radiais foram observadas apenas ao redor da ventosa ventral. Estas fibras são bastante grossas, ramificadas nas pontas e partem da ventosa ventral para a parede do corpo (Figura 13 F).

Os dois testículos na região posterior do parasito tiveram apenas as bordas irregulares bem marcadas. A vesícula seminal sigmóide, não foi vista com facilidade; ela apresenta uma marcação do ducto masculino que passa pela frente do ceco intestinal sinistralmente com uma região semelhante a um esfíncter bem marcada por faloidina e o ducto ejaculador que se une à parte terminal do útero para formar o átrio genital; o poro genital se abre dentro do

saco ventrogenital, o qual é anterosinistral à ventosa ventral e apresenta as fortes paredes do gonotil com 8-9 bolsas (Figura 13 E).

O ovário anterodextral aos testículos, apresentou paredes bem marcadas; perto do ovário o oviduto foi fortemente marcado em uma estrutura semelhante a um esfíncter. A vesícula excretora tem forma de X, com braços laterais anteriores e posteriores aos testículos (Figura 13 E).

A estrutura muscular do tegumento de metacercárias é similar à dos adultos (Figura 14 A). Células flama em forma de taça, aos pares, foram marcadas ao longo do corpo do parasito (Figura 14 B). O sistema reprodutor, apesar de não estar totalmente desenvolvido, foi fortemente marcado na metacercária (Figura 14 C-D). A vesícula excretora, com o seu formato de “X” característico é formada por fibras longitudinais fortemente marcadas pela faloidina formando o poro excretor subterminal (Figura 14 E-F).

O sistema nervoso visualizado na metacercária marcou sencilhas imunorreativas para serotonina na parte mais externa do tegumento (Figura 15 A). Imunoreatividade positiva foi encontrada também entre a pré-faringe e a faringe, com muitos gânglios e fibras nervosas formando uma estrutura em forma de colar (Figura 15 A). Outros gânglios foram também visualizados ao longo do corpo e ao nível da ventosa ventral (Figura 15 A-B).

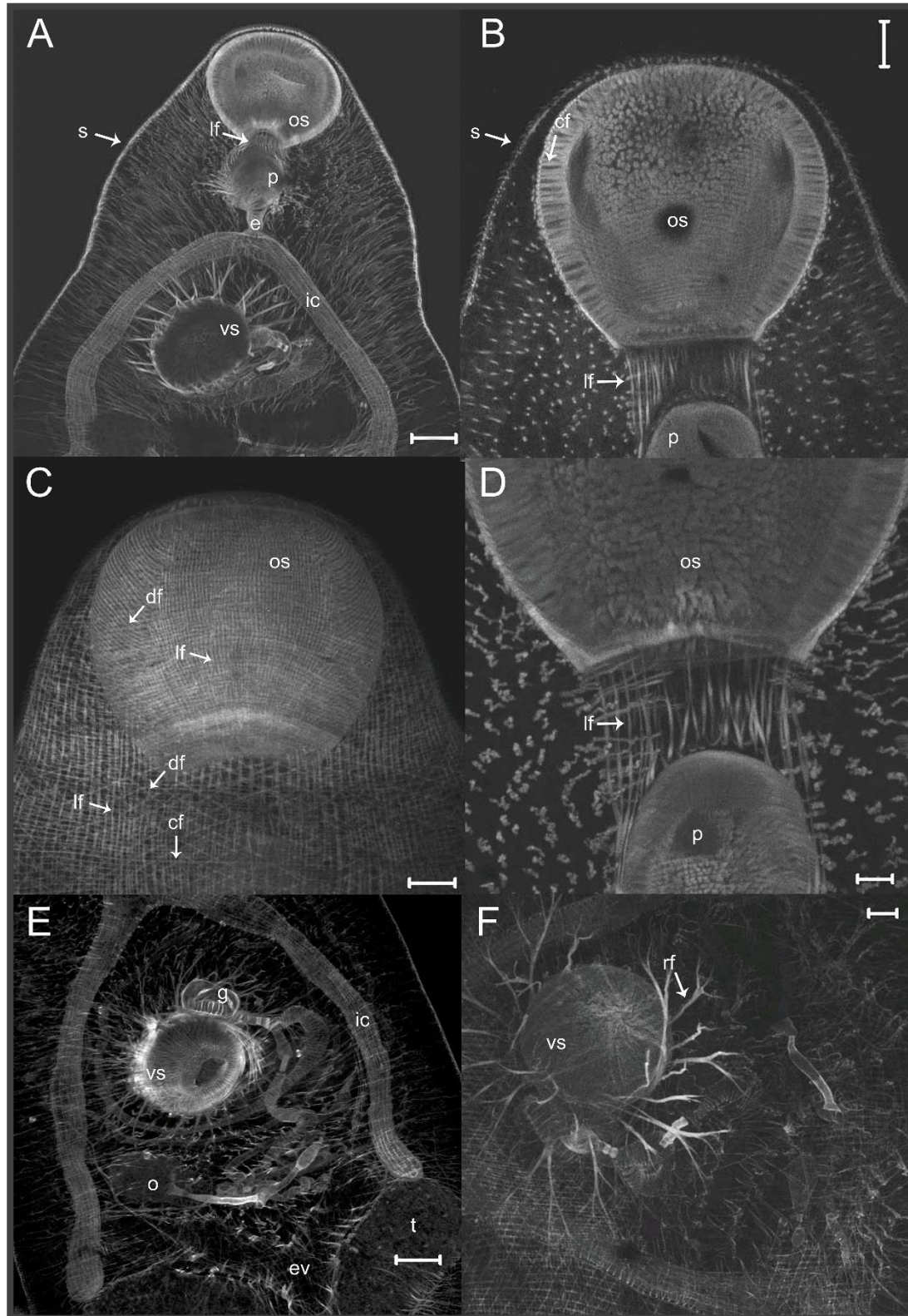


Figura 13: Imagens de MVLC de *Pygidiopsis macrostomum* adulto. (A) Visão ventral; (B) ventosa oral e pré-farínge; (C) visão externa das fibras do tegumento; (D) pré-farínge e farínge; (E) sistema reprodutor e ventosa ventral; (F) ventosa ventral com fibras radiais. Abreviações: (os) ventosa oral, (lf) fibras longitudinais, (p) farínge, (e) esôfago, (ic) ceco intestinal, (vs) ventosa ventral, (s) espinhos, (cf) fibras circulares, (df) fibras diagonais, (g) gonostil, (o) ovário, (ev) vesícula excretora, (t) testículos, (rf) fibras radiais. Escala: A, F=50µm, B,C,F=20µm, D= 10µm.

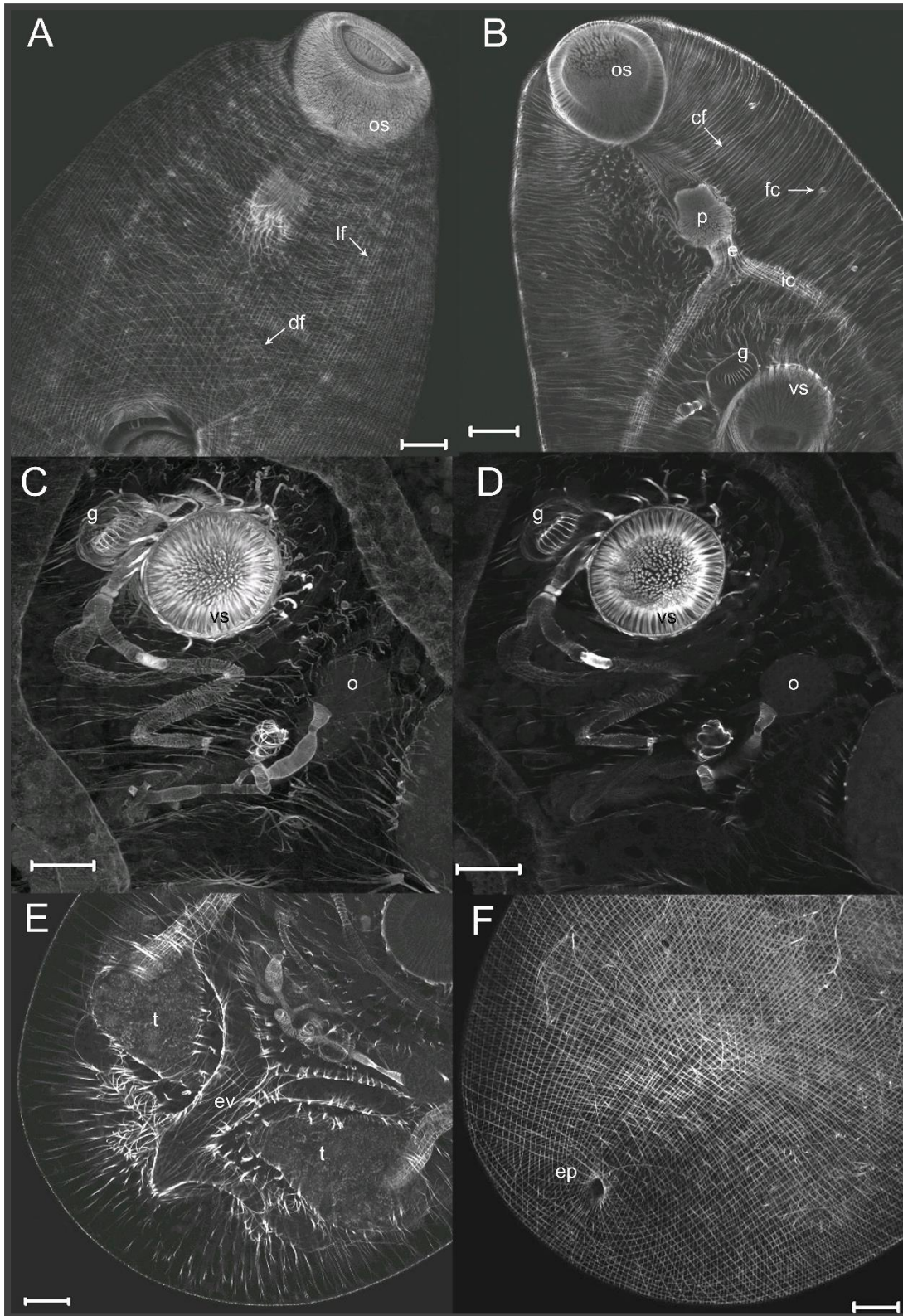


Figura 14: Imagens de MVLC de metacercárias de *Pygidiopsis macrostomum*. (A) Visão do tegumento externo; (B) Visão ventral com células flama; (C - D) sistema reprodutor; (E) Vesícula excretora (F) poro excretor. Abreviações: (os) ventosa oral, (lf) fibras longitudinais, (p) feringe, (e) esôfago, (ic) ceco intestinal, (vs) ventosa ventral, (s) espinhos, (cf) fibras circulares, (df) fibras diagonais, (g) gonotil, (o) ovário, (ev) vesícula excretora, (t) testículos (fc) células flama. Escala: A-F=50µm.



Figura 15: Imagens de MVLC de metacercárias de *Pygidiopsis macrostomum*. As setas indicam gânglios imunoreativos à serotonina na região anterior (A) e ao redor da ventosa ventral (B). Escala: A-B=50 μ m

5.3.2 Região gênica da subunidade menor do RNA ribossomal (18S rDNA)

No total foram obtidas quatro sequências de *Ascocotyle (Phagicola) longa*, duas sequências de *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* e sete sequências de *Pygidiopsis macrostomum* para a região 18S do rDNA. Não houve diferença intraespecífica entre as sequências. As distâncias interespecíficas foram de 0,023 entre *A. (P.) longa* e *A. (P.) pindoramensis*, 0,036 entre *A. (P.) longa* e *P. macrostomum* e de 0,053 entre *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum*.

As sequências mais similares à sequência de *A. (P.) pindoramensis* encontradas no GenBank foram *Pygidiopsis genata* Loos, 1907 (AY245710) e *Phagicolinae* sp. (AY245766) com 98% e 97% de similaridade respectivamente. Pelas análises do BLAST as sequências do GenBank de *Pholeter gastrophilus* (Kossack, 1910) (KM258668), *Phagicolinae* gen. sp. (AY245766) e *Pygidiopsis genata* (AY245710) apresentaram 99% de similaridade com *A. (P.) longa*. *P. macrostomum* apresentou 96% de similaridade com as sequências do GenBank de *Pholeter gastrophilus* (KM258668), *Metagonimus yokogawai* (HQ832630) e *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (HQ874608) de acordo com as análises do BLAST.

Duas sequências de *A. (P.) longa* depositadas no GenBank, uma proveniente da Argentina (KF697717) e outra de Israel (AY245703), juntamente com uma sequência de *A. (P.) nana*, foram alinhadas separadamente com nossas sequências de *A. (P.) longa*. Este alinhamento possui apenas 308 pares de bases pois as sequências da Argentina e de *A. (P.) nana* são muito curtas (Anexo III). *A. (P.) pindoramensis* não entrou neste alinhamento pois não possui pares de bases suficientes para alinhar com as sequências curtas. As distâncias filogenéticas variaram de 0,7% a 3,3% (Tabela 4).

A análise filogenética feita entre as sequências obtidas nesse trabalho e as sequências de espécies de Heterophyidae depositadas no GenBank (Figura 16) isolou *P. macrostomum* do restante dos heterofiídeos com moderado suporte de bootstrap, assim como a única sequência de *A. (P.) longa* (= *Phagicola longa*) (AY245703) já depositada no GenBank. A análise coloca nossos *A. (P.) longa* e *A. (P.) pindoramensis* como grupos irmãos dentro de um mesmo clado com alto suporte estatístico (83%), porém dentro deste clado também se encontram

Pygidiopsis genata (AY245710) e *Pholeter gastrophilus* (KM258668) agrupado com *A. (P.) longa* com 99% de suporte. Espécies de *Metagonimus* agruparam com *Dexigonimus ciureanus*, sinônimo de *Metagonimus ciureanus* (Witengerg, 1929) com 93% de suporte. Espécies de *Haplorchis* e *Procevorum* formaram grupos irmãos no mesmo clado com 80% de suporte de 'bootstrap'.

5.3.3 Região gênica da subunidade maior do RNA ribossomal (28S rDNA)

No total foram obtidas quatro sequências de *A. (P.) longa*, duas sequências de *A. (P.) pindoramensis* e cinco de *P. macrostomum* para a região 28S do rDNA. Não houve variação intraespecífica entre as sequências em nenhuma destas espécies. As distâncias interespecíficas foram de 0,064 entre *A. (P.) longa* e *A. (P.) pindoramensis*, de 0,113 entre *A. (P.) longa* e *P. macrostomum* e 0,112 entre *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum*.

As sequências mais similares à de *A. (P.) pindoramensis* encontradas no GenBank foram *Pholeter gastrophilus* (KM258674) e *Metagonimoides oregonensis* Price, 1931 (JQ995473) com 94% e 92% de similaridade respectivamente. Com relação a *A. (P.) longa*, as sequências do GenBank que apresentaram maior similaridade foram *P. gastrophilus* (KM258674) e *M. oregonensis* (JQ995473) com 90% e 92% de similaridade respectivamente. *P. macrostomum* apresentou 90% de similaridade com as sequências de *P. gastrophilus* (KM258674) e 88% com *Clonorchis sinensis* (JF823989) e *Metagonimoides oregonensis* (JQ995473) de acordo com o BLAST.

Na análise filogenética da região 28S do rDNA (Figura 17), as espécies *A. (P.) longa*, *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum* formam um clado com 82% de suporte de 'bootstrap'. Dentro deste clado se encontra *P. gastrophilus* formando um grupo irmão com *A. (P.) pindoramensis*. *Cryptocotyle lingua* e *Euryhalmis costaricensis* Brenes-Madrigal, Arroyo-Sancho & Jimenez-Quiros, 1960 se agruparam com 97% de 'bootstrap'. As espécies de *Metagonimus* formam um grupo monofilético com 100% de suporte estatístico e espécies de *Procerovum* e *Haplorchis* aparecem juntas no mesmo clado com 93% de suporte.

Tabela 4: Distâncias p (convertidas em porcentagem) entre as Sequências de *Ascocotyle (Phagicola) longa* obtidas neste trabalho e sequências de *A. (P.) longa* e *A. (P.) nana* depositadas no GenBank para a região 18S rDNA, baseadas em alinhamento com 308 pares de bases.

Amostra	<i>Ascocotyle (Phagicola) longa</i>				<i>A. (P.) nana</i>
	E271	E387	AY245703	KF697717	KM659174
E271	0	0	3,3%	2,3%	2,9%
E387		0	3,3%	2,3%	2,9%
AY245703			0	2,9%	2,3%
KF697717				0	0,7%

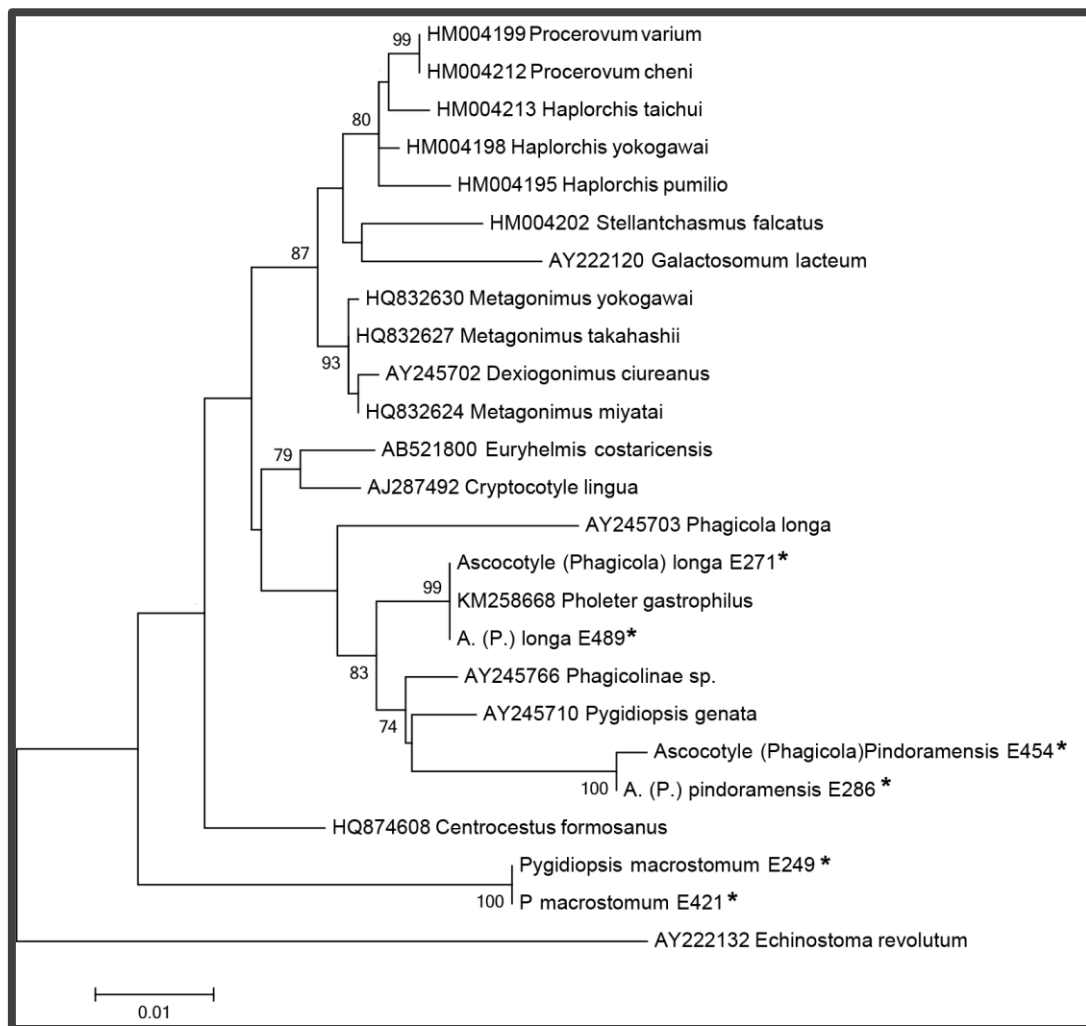


Figura 16: Reconstrução filogenética utilizando ML baseada nos alinhamentos de sequências de *A. (P.) longa*, *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum* deste trabalho (*) com sequências de Heterophyidae do GenBank para a região 18S rDNA. Os valores na frente dos nós representam a porcentagem de 'bootstrap'. *Echinostoma revolutum* representa o grupo externo.

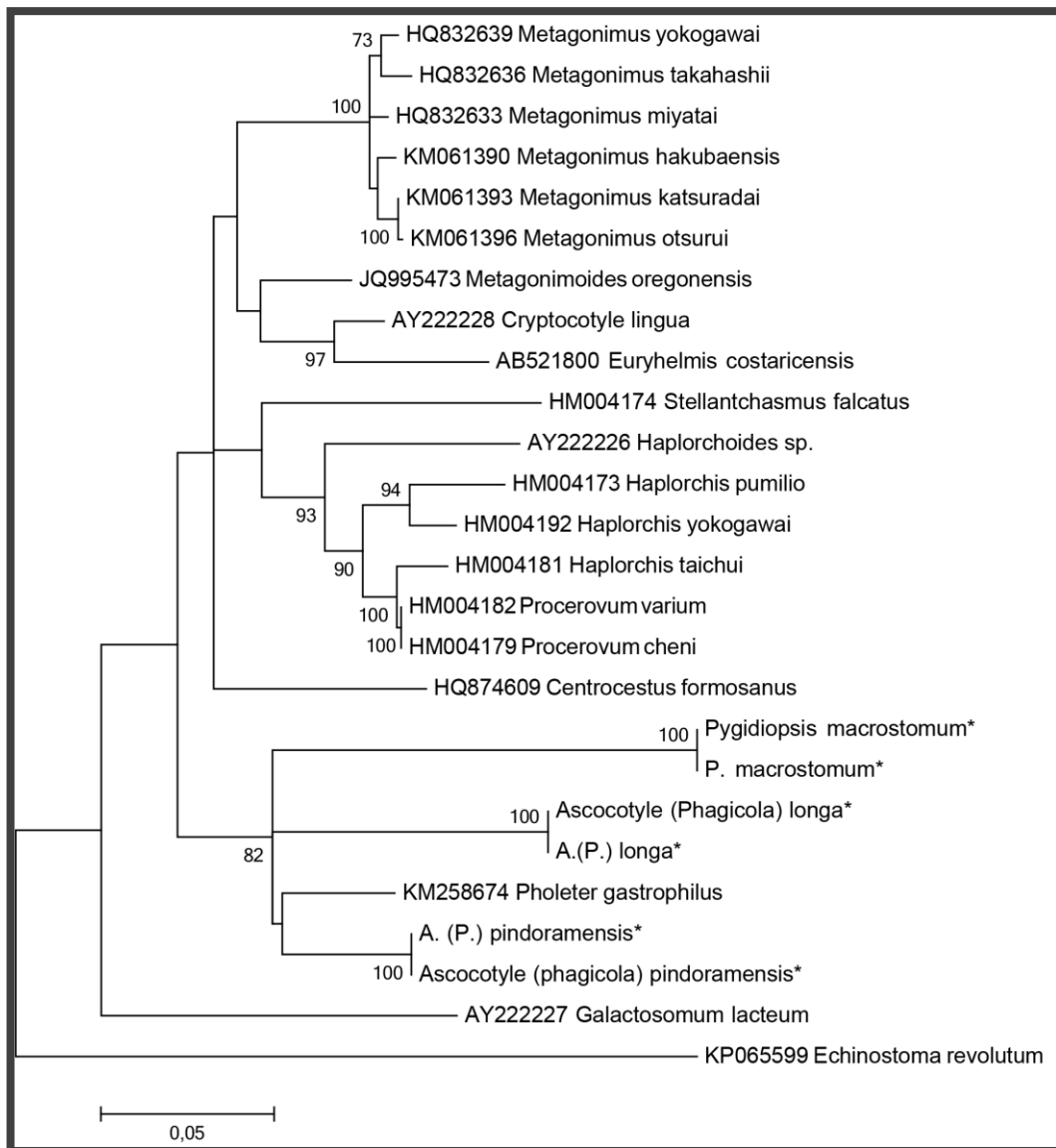


Figura 17: Reconstrução filogenética utilizando ML baseada nos alinhamentos de seqüências de *A. (P.) longa*, *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum* deste trabalho (*) com seqüências de Heterophyidae do GenBank para a região 28S rDNA. Os valores na frente dos nós representam a porcentagem de 'bootstrap'. *Echinostoma revolutum* representa o grupo externo.

5.3.4 Região gênica do Espaçador Interno Transcrito 2 (ITS2 rDNA)

No total foram obtidas dez sequências de cada uma das três espécies estudadas para a região ITS2 do rDNA. *A. (P.) longa* e *A. (P.) pindoramensis* não apresentaram diferenças intraespecíficas. As sequências de *P. macrostomum* apresentaram diferenças intraespecíficas, variando de 0,004 a 0,019 (Tabela 5). As distâncias interespecíficas entre as espécies foram de 0,128 entre *A. (P.) longa* e *A. (P.) pindoramensis*, de 0,225 a 0,229 entre *A. (P.) longa* e *P. macrostomum* e de 0,213 a 0,217 entre *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum*. As sequências de *P. macrostomum* apresentaram três haplótipos. Além de substituição de nucleotídeos apresentadas nas posições 183, 184, 394 e 406 do alinhamento, os haplótipos um e dois apresentam deleção de duas bases nas posições 192 e 193 do alinhamento e o haplótipo três apresentou deleção de duas bases nas posições 187 e 188 do alinhamento (Anexo III).

As sequências mais similares à sequência de *A. (P.) pindoramensis* encontradas no GenBank foram *Pygidiopsis genata* (AY245710) e *Metagonimus otsurui* Saito & Hori, 1962 (KM061405) com 96% e 87% de similaridade respectivamente. Pelas análises do BLAST as sequências do GenBank *Pholeter gastrophilus* (KT883855), *Haplorchis taichui* (KP165440) e *Pygidiopsis genata* (AY245710) apresentaram 91%, 90% e 86% de similaridade com *A. (P.) longa*, respectivamente. *P. macrostomum* apresentou 91% de similaridade com *Pygidiopsis genata* (AY245710) e 90% com *Pholeter gastrophilus* (KT883855) de acordo com as análises do BLAST.

Na análise filogenética para a região ITS2 do rDNA (Figura 18) As espécies estudadas neste trabalho estão agrupadas em um mesmo clado porém com baixíssimo suporte de 'bootstrap' (44%). Neste clado *P. macrostomum* forma um grupo irmão com o espécime de *A. (P.) longa* depositado no GenBank enquanto *A. (P.) longa* deste estudo forma um grupo irmão com *A. (P.) pindoramensis* e *Pygidiopsis genata* que agruparam juntos com 98% de suporte estatístico. Os gêneros *Haplorchis* e *Procerovum* formam grupos irmãos com 99% de suporte de 'bootstrap'. Espécies de *Metagonimus* agruparam novamente com *Dexigonimus* com alto suporte estatístico (98%).

Tabela 5: Distância p entre as sequências de *Pygidiopsis macrostomum* obtidas neste estudo expressas em porcentagem. As cores representam os haplótipos encontrados: Azul-hapl1, laranja-hapl2, verde hapl3.

Amostra	<i>Pygidiopsis macrostomum</i>									
	E250	E375	E275	E490	E500	E421	E374	E501	E531	E508
E250	0									
E375	0	0								
E275	0	0	0							
E490	0,4%	0,4%	0,4%	0						
E500	0,8%	0,8%	0,8%	0,4%	0					
E421	0,4%	0,4%	0,4%	0	1,9%	0				
E374	1,6%	1,6%	1,6%	1,6%	1,9%	0,16%	0			
E501	1,6%	1,6%	1,6%	1,6%	1,9%	0,16%	0	0		
E531	1,6%	1,6%	1,6%	1,6%	1,9%	0,16%	0	0	0	
E508	1,6%	1,6%	1,6%	1,6%	1,9%	0,16%	0	0	0	0

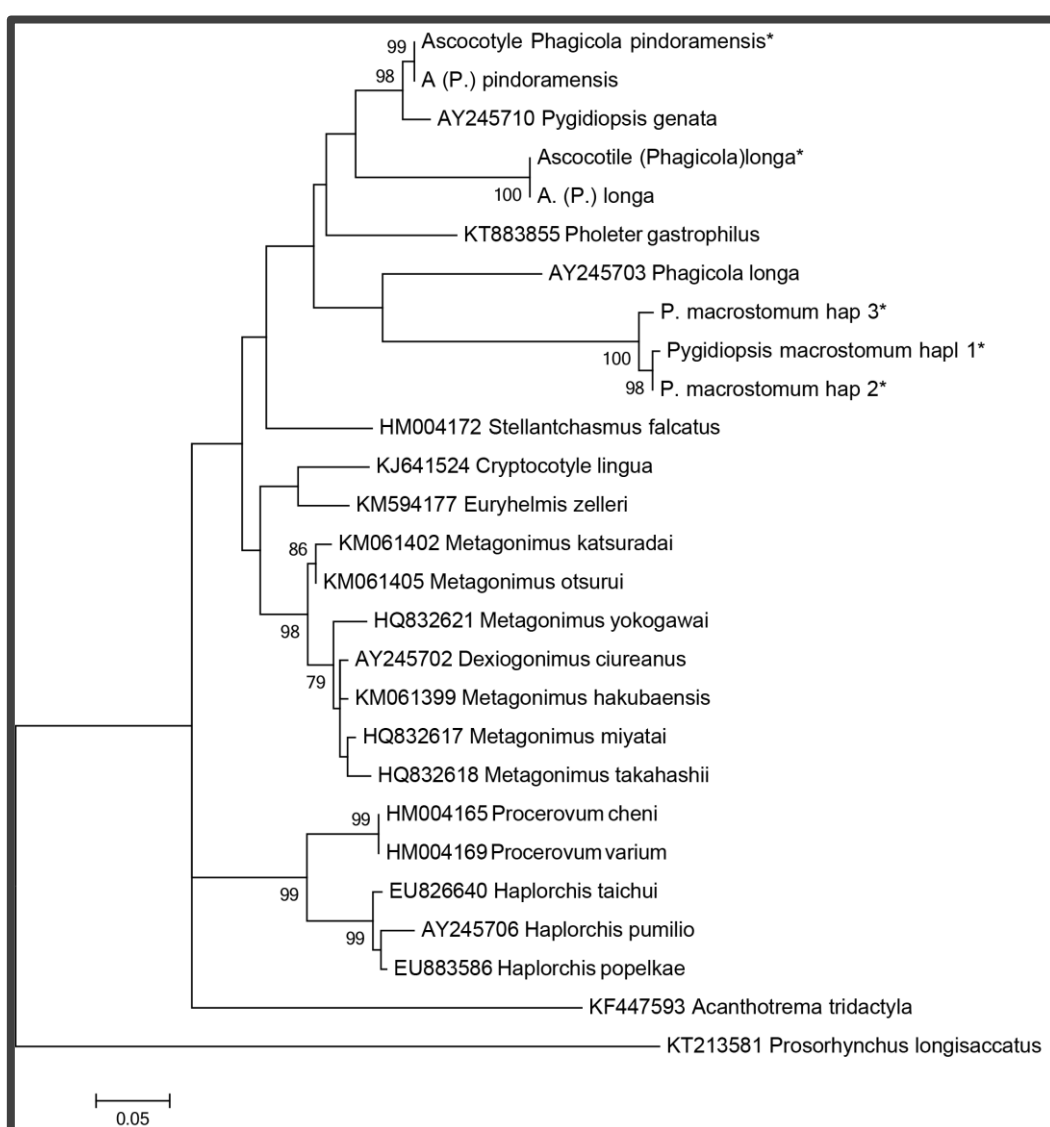


Figura 18: Reconstrução filogenética utilizando ML baseada nos alinhamentos de sequências de *A. (P.) longa*, *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum* deste trabalho (*) com sequências de Heterophyidae do GenBank para a região ITS2 rDNA. Os valores na frente dos nós representam a porcentagem de 'bootstrap'. *Prosorhynchus longisaccatus* representa o grupo externo.

5.3.5 Região gênica codificante da Citocromo Oxidase I do DNA mitocondrial (mtDNA *cox-1*)

No total foram obtidas quatro sequências de *Ascocotyle (Phagicola) longa*, dez sequências de *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* e oito sequências de *Pygidiopsis macrostomum* para a região *Cox I* do DNA mitocondrial. Foram encontrados três haplótipos de *A. (P.) longa*, sete haplótipos de *A. (P.) pindoramensis* e cinco haplótipos de *P. Macrostomum*. Em sua maioria os haplótipos variaram apenas por uma substituição de nucleotídeo (Anexo III). As sequências das três espécies apresentaram diferenças intraespecíficas, *A. (P.) pindoramensis* teve distância p de 0,037, *A. (P.) longa* apresentou distância p de 0,009 e *P. macrostomum* de 0,009 a 0,019. As sequências de *A. (P.) longa* apresentaram substituições em 8 posições do alinhamento, porém somente as posições 18 e 31 resultaram em substituição de aminoácidos (Anexo III). *A. (P.) pindoramensis* apresentou substituições em 16 posições do alinhamento, em sua maioria foram substituições silenciosas exceto nas posições 9, 23, 174 e 285 nas quais ocorrem substituições de aminoácidos (Anexo III). As sequências de *P. macrostomum* apresentaram substituições em 21 posições do alinhamento, destas as posições 31, 274 e 286 foram responsáveis por substituição de aminoácidos (Anexo III). As distâncias interespecíficas variaram de 0,037 a 0,046 entre *A. (P.) longa* e *A. (P.) pindoramensis*, de 0,028 a 0,046 entre *A. (P.) longa* e *P. macrostomum* e de 0,019 a 0,028 entre *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum*.

As sequências mais similares à sequência de *A. (P.) pindoramensis* encontradas no GenBank foram *Paragonimus kellicotti* Ward, 1908 (JF417708) e *Plagiorchis koreanus* Ogata, 1938 (KJ533417) ambos com 82% de similaridade. Pelas análises do BLAST as sequências do GenBank *Cryptocotyle lingua* (EU876334) e *Plagiorchis elegans* (Rudolphi, 1802) (KJ533416) apresentaram 91% e 86% de similaridade com *A. (P.) longa*, respectivamente. *P. macrostomum* apresentou 84% de similaridade com *Cryptocotyle lingua* (EU876334) e *Haplorchis taichui* (JX174294) de acordo com as análises do BLAST.

Na análise filogenética para a região mtDNA *cox-1* as espécies estudadas neste trabalho estão agrupadas em um mesmo clado porém com baixíssimo

suporte de “bootstrap” (44%). Neste clado *P. macrostomum* forma um grupo irmão com o espécime de *A. (P.) longa* depositado no GenBank enquanto *A. (P.) longa* deste estudo forma um grupo irmão deste clado. *A. (P.) pindoramensis* foi agrupado com *Pygidiopsis genata* com 98% de suporte estatístico. Os gêneros *Haplorchis* e *Procerovum* formam grupos irmãos com 100% de suporte de bootstrap. Uma vez mais, espécies do gênero *Metagonimus* agruparam com uma espécie de *Dexigonimus* com alto suporte estatístico (Figura 19).

5.3.6 Análises Filogenéticas de Heterophyidae e Opisthorchiidae

Uma análise filogenética baseada nos alinhamentos de Heterophyidae e Opisthorchiidae depositados no GenBank com as sequências deste trabalho foi feita para as regiões genéticas ITS2 rDNA e mtDNA *cox-1*.

Nas análises feitas para a região ITS2 rDNA, as sequências deste estudo agruparam em um mesmo clado com baixo suporte estatístico sendo que *Pholeter gastrophilus* encontra-se neste clado que é composto somente pelos gêneros *Ascocotyle* e *Pygidiopsis*. *A. (P.) pindoramensis* e *Pygidiopsis genata* aparecem como grupos irmãos neste clado. Os cladogramas formados por espécies do gênero *Metagonimus*, *Haplorchis* e *Procerovum* apresentam alto suporte estatístico (92%, 100% e 97%, respectivamente), assim como o clado formado por todas as espécies de Opisthorchiidae (93%). Porém, o Opisthorchiídeo *Euamphimerus pancreaticus* Baer, 1960 agrupou como um grupo irmão dos cladogramas de espécies de *Haplorchis* e *Procerovum* (Figura 20)

Nas análises filogenéticas feitas para a região do mtDNA *cox-1*, a maior parte dos Heterophyidae agruparam em um clado com quatro grupos distintos: um com *A. (P.) pindoramensis*, um com *P. macrostomum*, um em que *A. (P.) longa* forma um grupo irmão com *Cryptocotyle lingua* e outro com espécies dos gêneros *Acanthotrema* Travassos, 1928, *Stellantchasmus*, *Galactosomum* Looss, 1899 e *Metagonimus*. As espécies de Opisthorchiidae agruparam juntas em um grande grupo com 97% de suporte estatístico, porém dentro deste grupo encontra-se também o heterofiídeo *P. genata* formando um grupo irmão com *Clonorchis sinensis*. A única espécie de Opisthorchiidae fora deste grupo foi *Euamphimerus pancreaticus* que agrupou em um clado formado por espécies do gênero *Haplorchis* e *Procerovum* (Figura 21).

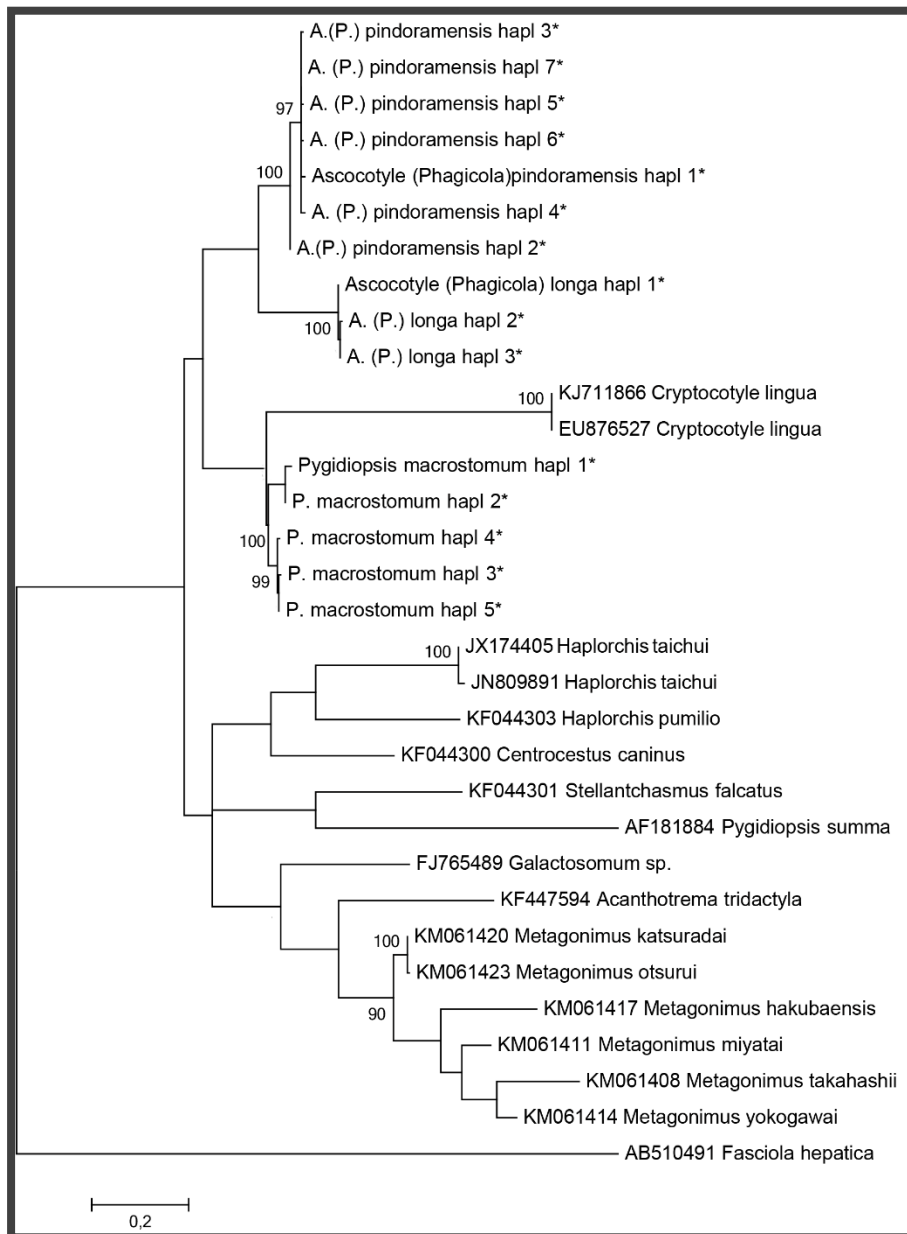


Figura 19: Reconstrução filogenética utilizando ML baseada nos alinhamentos de seqüências de *A. (P.) longa*, *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum* deste trabalho (*) com seqüências de Heterophyidae do GenBank para a região mtDNA *cox-1*. Os valores na frente dos nós representam a porcentagem de 'bootstrap'. *Fasciola hepatica* representa o grupo externo.

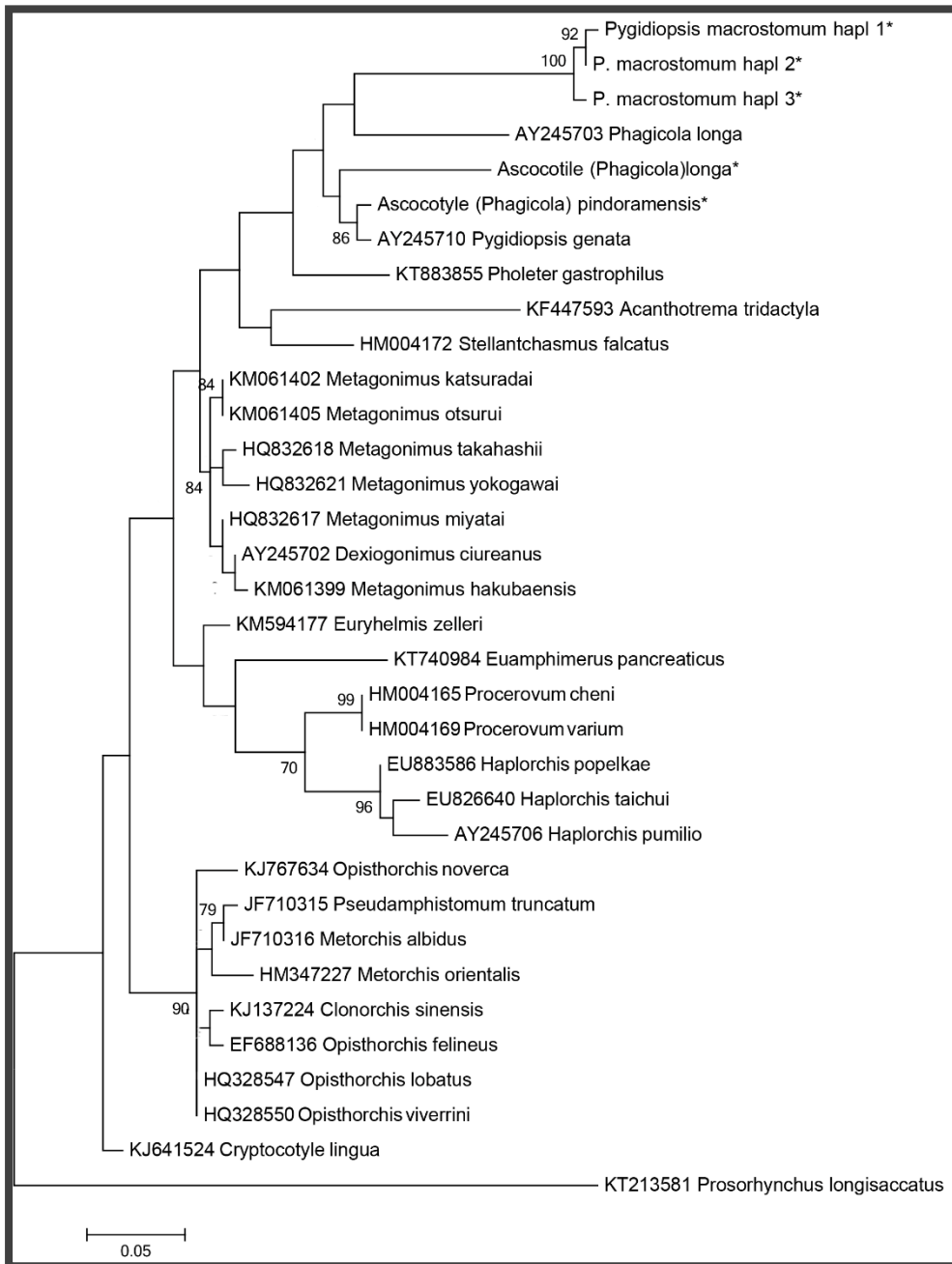


Figura 20: Reconstrução filogenética utilizando ML baseada nos alinhamentos de seqüências de *A. (P.) longa*, *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum* deste trabalho (*) com seqüências de Heterophyidae e Opisthorchiidae do GenBank para a região ITS2 rDNA. Os valores na frente dos nós representam a porcentagem de 'bootstrap'. *Prosorhynchus longisaccatus* representa o grupo externo.

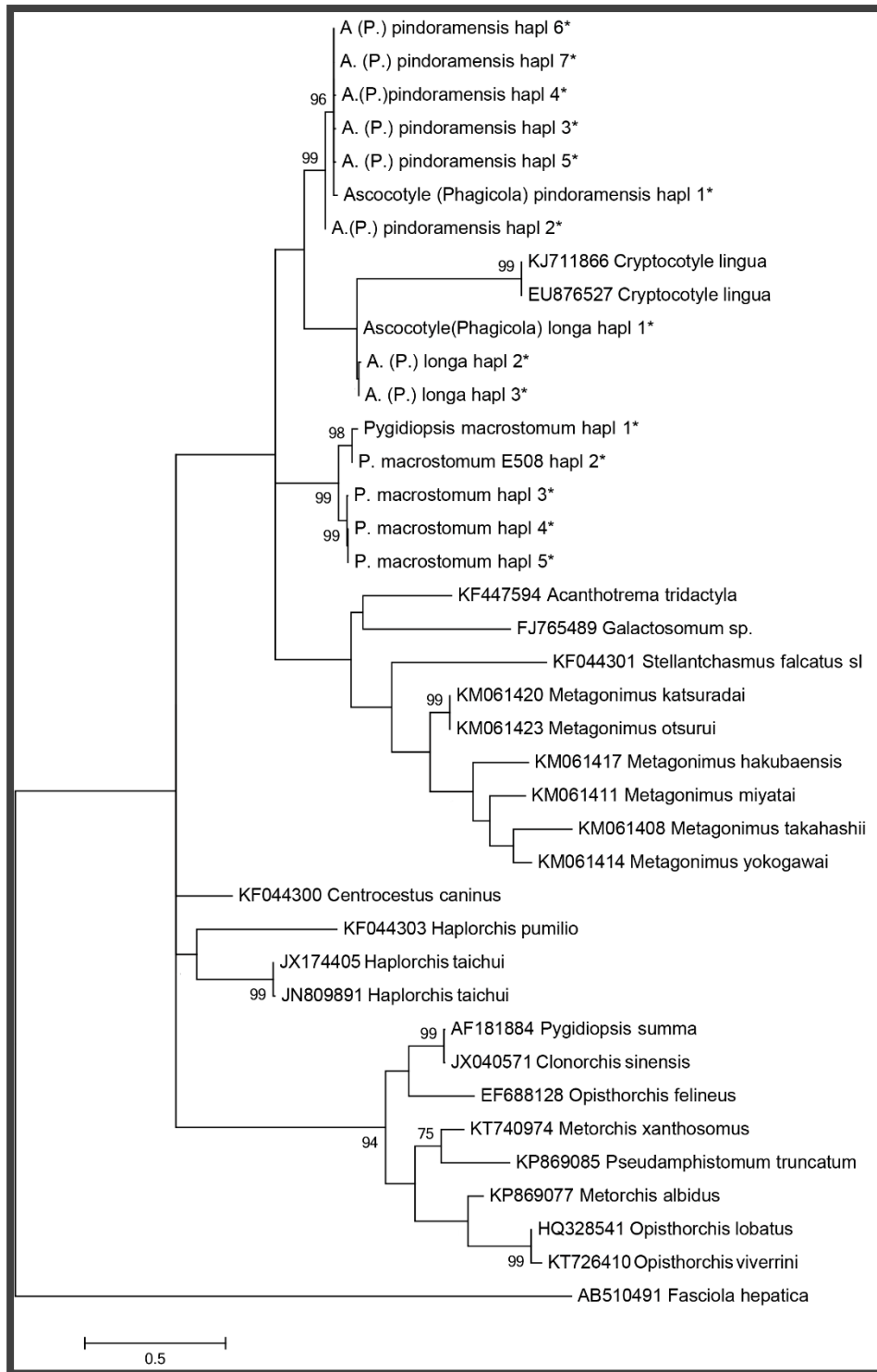


Figura 21: Reconstrução filogenética utilizando ML baseada nos alinhamentos de seqüências de *A. (P.) longa*, *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum* deste trabalho (*) com seqüências de Heterophyidae e Opisthorchiidae do GenBank para a região ITS2 rDNA. Os valores na frente dos nós representam a porcentagem de 'bootstrap'. *Fasciola hepatica* representa o grupo externo.

5.4 DISCUSSÃO

Neste capítulo foi feita a caracterização genética de *Ascocotyle (Phagicola) longa*, *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* e *Pygidiopsis macrostomum*, assim como um estudo ultraestrutural de *P. macrostomum* baseado em imagens de microscopia de varredura a laser confocal. Estes Heterophyidae que completam seus ciclos na Lagoa Rodrigo de Freitas e têm diversos peixes do local como hospedeiros intermediários representam um risco para o aparecimento de zoonoses emergentes na zona urbana da cidade do Rio de Janeiro (Simões et al. 2010, Santos et al. 2013). Desta forma a caracterização morfológica e genética aliada ao conhecimento da ecologia e ciclos de vida destas espécies são de suma importância para a diagnose e controle de parasitoses emergentes.

As imagens de microscopia confocal revelaram que o tegumento de metacercárias e adultos de *P. macrostomum* segue a estrutura característica do tegumento dos Digenea (Smyth e Halton 1983; Threadgold 1984). As fibras musculares diagonais, circulares e longitudinais, bem marcadas nas imagens de confocal, já foram vistas em outros parasitos digenéticos (Mair et al. 2000; Šebelová et al. 2004; Santos et al. 2013; Terenina et al. 2015).

Nas nossas imagens de confocal, a ventosa oral muscular e sem espinhos foi bem evidenciada pela técnica. Em um estudo recente com *A. (P.) longa*, a ventosa oral também foi bem marcada porém diferentemente de *P. macrostomum*, este órgão apresentou lobo pré-oral e uma fileira de espinhos ao redor da ventosa. Outras diferenças encontradas entre as duas espécies foram o gonotil bipartido visto em *A. (P.) longa* enquanto em *P. macrostomum* ele não é dividido, apresentando gonotil com 8-9 bolsas e as fibras radiais ao redor da ventosa ventral encontradas em *P. macrostomum* mas ausentes em *A. (P.) longa* (Santos et al. 2013).

As fibras radiais presentes ao redor da ventosa ventral foram descritas com uma organização similar somente em *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Mair et al. 1998). Mair et al. (2000) e Šebelová et al. (2004) encontraram fibras radiais menores e mais finas compondo as ventosas de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 e *Echinostoma caproni* Richard, 1964, enquanto em *A. (P.) longa*, uma espécie filogeneticamente mais próxima de *P. macrostomum*, o mesmo tipo

de fibras não foram visualizadas por microscopia confocal (Santos et al. 2013). Neste estudo, também foi possível visualizar a união do útero com o duto ejaculador formando o átrio genital em *P. macrostomum*, uma característica já descrita em *A. (P.) longa* (Santos et al. 2013).

Os gânglios cefálicos encontrados ao redor da pré-faringe e faringe podem ser considerados um “cérebro” verdadeiro, já que este é o centro de inibição e controle dos reflexos da rede de nervos periféricos (Halton & Gustafsson 1996). Nossos resultados também estão de acordo com aqueles apresentados para outros trematódeos, como *E. caproni*, *Opisthorchis viverrini* e *Opisthioglyphe ranae* (Frohlich, 1791) (Šebelová et al. 2004; Leksomboon et al. 2012; Terenina et al. 2015). Embora os gânglios tenham sido bem marcados, a região anterior de trematódeos normalmente apresenta grandes comissuras que compõem o sistema nervoso central do parasito, porém estas comissuras foram levemente marcadas em nossas imagens. Isto pode ter acontecido porque usamos metacercárias, que são um estágio quiescente no ciclo de vida da maioria dos trematódeos. De maneira similar, Šebelová et al. (2004), usando 5-HT-IR para marcar serotonina em metacercárias e rédias de *E. caproni*, observou marcação mais forte apenas em rédias.

A variabilidade genética é um dos principais fatores que proporcionam a sobrevivência de espécies e possibilita a resiliência de ecossistemas. O conhecimento da estrutura genética de populações de parasitos juntamente com dados biogeográficos permite o entendimento de sua ecologia, ciclos de vida e padrões evolutivos permitindo o desenvolvimento de estratégias para o controle de parasitoses (Brusentsov et al 2013).

Estudos genéticos de Platyhelminthes têm utilizado classicamente os marcadores nucleares do DNA ribossomal para elucidar questões taxonômicas em diferentes níveis (Olson e Tkach 2005). Neste estudo obtivemos sequências genéticas das três espécies estudadas para as regiões 18S, 28S e ITS2 do DNA ribossomal.

As taxas evolutivas dos genes ribossomais variam amplamente dependendo da região de escolha. Sabe-se que a subunidade menor do ribossomo apresenta extensas regiões altamente conservadas fazendo com que seja uma região de primeira escolha para filogenias de taxa superiores. Apesar de mais variável, a subunidade maior do ribossomo também apresenta alto grau

de conservação entre espécies, o que pode dificultar a construção de filogenias robustas para espécies próximas (Hillis e Dixon 1991). Neste trabalho, obtivemos sequências das duas regiões do DNA ribossomal citadas para *A. (P.) longa*, *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum*. Nenhuma das três espécies apresentou variabilidade intraespecífica nestas regiões, e pouca variação interespecífica foi verificada entre as três espécies também. As análises de similaridade de sequências realizadas com o auxílio do aplicativo BLAST para as regiões 18S e 28S demonstraram alta similaridade (em alguns casos acima de 95%) com espécies de gêneros diferentes, corroborando o que diz a literatura com relação ao alto grau de conservação destas duas regiões. Apesar disso a topologia obtida nas análises utilizando os dois marcadores conseguiu a separação de diversos gêneros de heterofiídeos com alto suporte estatístico demonstrando que apesar de não serem marcadores de primeira escolha para resolver problemas taxonômicos de taxa inferiores, podem ser utilizados em análises concatenadas com genes que apresentem taxas de evolução mais elevadas, para resultados mais robustos de análises filogenéticas.

Os espaçadores transcritos estão entre as regiões mais variáveis do DNA ribossomal fazendo com que sejam cada vez mais utilizadas para separação de espécies crípticas, reconhecimento de espécies e construção de filogenias de espécies muito próximas (Hillis e Dixon 1991, Olson e Tkach 2005, Králová-Hromadová et al. 2008). Trabalhos analisando a variabilidade da região genética ITS em Digenea têm atestado a região ITS1 como mais variável do que a ITS2 em decorrência de trechos repetitivos que podem sofrer deleções e alterar tanto o tamanho como a composição nucleotídica desta região (Van Herwerden et al. 1999, Nolan e Cribb 2005). A região ITS2 não possui estes trechos repetitivos, porém sua composição nucleotídica também pode ser altamente variável e em muitos casos pode representar uma boa alternativa à região ITS1, uma vez que as variações de tamanho podem dificultar os alinhamentos (Van Herwerden et al. 1999, Hinrich et al. 1999, Hillis e Dixon 1991). As sequências obtidas neste trabalho para as espécies de *Ascocotyle* da região ITS2 do rDNA se mostraram altamente conservadas; de fato não houve variabilidade intraespecífica em nenhuma das duas espécies estudadas deste gênero, diferentemente das sequências obtidas para *P. macrostomum* que apresentaram três haplótipos. As distâncias intraespecíficas entre sequências dos haplótipos de *P. macrostomum*

(1,9%) parecem ser aceitáveis para considerar o parasito uma única espécie, uma vez que trabalhos relatando a variabilidade da região ITS2 em outros Digenea encontraram distâncias maiores que 5% para espécies do mesmo gênero, porém estudos populacionais relatando diferenças intraespecíficas para espécies de heterofiídeos ainda são escassos (Miller e Cribb 2007). Em trabalhos feitos com *Fasciola magna* (Králová-Hromadová et al. 2008) e espécies do gênero *Haplorchis* (Thaenkham et al. 2010) não houve variabilidade intraespecífica nesta região genética de modo que mais estudos buscando caracterizar a população de *P. macrostomum* com diferentes marcadores genéticos são necessários.

Na filogenia construída da região ITS2 com outros Heterophyidae as espécies deste estudo agruparam com espécies do gênero *Pygidiopsis* e *Ascocotyle* previamente depositados no GenBank, porém o suporte estatístico para este clado foi extremamente baixo. Algo notável foi a posição de *Pygidiopsis genata*, que em nossas análises agruparam com *A. (P.) pindoramensis* com alto suporte estatístico (98%) e não com *P. macrostomum*. Este espécime de Israel não foi descrito morfologicamente por Dzikowski et al. (2004), porém por se tratar de um espécime adulto há pouco risco de erro na identificação. As espécies de *P. macrostomum* deste estudo apresentaram uma elevada variabilidade na região ITS2 de modo que esta alta variabilidade possa ser uma característica do gênero e tenha colaborado para que as duas espécies congêneras não ficassem no mesmo clado.

Com relação à morfologia de espécies do gênero *Pygidiopsis*, alguns autores propuseram que as espécies deveriam ser separadas em três grupos morfológicos de acordo com a presença ou ausência de espinhos na ventosa oral e distribuição de útero e vitelinos (Dronen et al. 2004, Simões et al. 2005, Sohn et al 2016), segundo a proposição destes autores *P. macrostomum* seria sempre um morfotipo separado de *P. genata*, o que dá suporte à separação encontrada nas análises genéticas. Além disso *A. (P.) pindoramensis* foi originalmente descrito como *Pygidiopsis pindoramensis* até recentemente quando foi redescrito por Simões et al. (2006). Embora as características morfológicas separem bem os dois gêneros, análises genéticas com mais espécies de ambos os gêneros são necessárias para eleger características morfológicas mais relevantes na filogenia e confirmar esta separação.

Nas análises deste estudo para a região mtDNA *cox-1* foi encontrado grande número de haplótipos das três espécies, porém em sua maioria eram haplótipos únicos com substituições pontuais. *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum* apresentaram maior variabilidade intraespecífica do que *A. (P.) longa*, isso pode ter ocorrido pelo menor número de sequências de *A. (P.) longa* analisados para esta região. Também é importante relatar que metacercárias de *A. (P.) longa* da Lagoa Rodrigo de Freitas foram descritas apenas em *Mugil liza* enquanto *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum* são descritos em diversas espécies de barrigudinhos. Esta flexibilidade para parasitar diferentes hospedeiros pode estar ligada à variabilidade genética encontrada em *A. (P.) pindoramensis* e *P. macrostomum*. Estudos relatando a grande variabilidade intraespecífica para a região mtDNA *cox-1* e a ocorrência de diversos haplótipos com substituições pontuais são encontrados para outros trematódeos como *Haplorchis tauchui* (Dung et al. 2013), *Opisthorchis felineus* (Brusentsov et al. 2013) e *Fasciola hepatica* (Krállová-Hromadová et al. 2008). Genes mitocondriais costumam ter taxas evolutivas mais elevadas do que genes nucleares e devido ao grande número de substituições acumuladas não demonstram sinal filogenético forte para elucidar relações em grupos muito antigos como é o caso dos Plathyhelminthes (Olson e Tkach 2005). Na análise filogenética baseada nos alinhamentos com outros heterofiídeos depositados no GenBank para a região mtDNA *cox-1*, *A. (P.) longa* ficou em um clado separado de *A. (P.) pindoramensis*, que agrupou com *P. macrostomum*, enquanto *A. (P.) longa* agrupou com *Cryptocotyle lingua*. Um espécime de *Pygidiopsis summa* depositado no GenBank ficou separado de todos os outros Heterophyidae não formando nenhum clado. De maneira geral a árvore para esta região apresentou baixíssimos valores de 'bootstrap' para nós internos, o que pode indicar falta de sinal filogenético para elucidar a relação entre os gêneros de Heterophyidae.

Trabalhos recentes têm sido feitos para elucidar as relações filogenéticas de Heterophyidae (Dzikowski et al. 2004, Thaenkham et al. 2010, Thaenkham et al. 2011b, Thaenkham et al. 2012, Lee et al. 2013, Chontanarith et al. 2014, Al-kandari et al. 2015). A família Heterophyidae possui 37 gêneros descritos morfológicamente e centenas de espécies que têm como hospedeiros definitivos aves e mamíferos (Yamaguti, 1971, Pearson, 2008). Destes 37 gêneros, 17 estão representados no GenBank com pelo menos uma sequência. Embora este

número represente quase metade dos gêneros descritos ainda há muita disparidade na quantidade de sequências depositadas para representantes de certos gêneros em detrimento de outros. Em geral espécies dos gêneros que têm importância médica ou veterinária são os mais amplamente representados, contam com diversas espécies depositadas no banco de dados e maior quantidade de informações disponíveis sobre sua taxonomia, ecologia e patologia. Os gêneros *Haplorchis*, *Procerovum* e *Metagonimus* contam com diversas sequências de diferentes espécies e diferentes regiões gênicas depositadas no GenBank. Não por acaso foram os gêneros que apresentaram grupos monofiléticos com alto suporte estatístico nas análises realizadas neste trabalho.

Considera-se que muitas espécies de heterofiídeos têm distribuição cosmopolita. Um exemplo é *A. (P.) longa*, já descrito em três continentes (Scholz 1999, Simões et al. 2010, Santos et al. 2013). Nas análises filogenéticas deste trabalho as sequências de nossos espécimes não agruparam com a sequência de *A. (P.) longa* de Israel depositada no GenBank, sendo a distância filogenética entre elas para a região ITS2 de 18,7%, uma distância que pode ser considerada grande para indivíduos da mesma espécie. Para a região 18S do rDNA haviam duas sequências parciais no GenBank, uma proveniente de Israel (AY245703) e outra proveniente da Argentina (KF697717). As distâncias genéticas de *A. (P.) longa* deste estudo em relação a estas duas sequências foram de 3,3% e 2,3%, respectivamente. Por seu alto grau de conservação, a região 18S não costuma ter variações em indivíduos da mesma espécie. Estes resultados alertam para a necessidade de trabalhos que envolvam taxonomia clássica e genética para avaliar a situação de espécies com ampla distribuição geográfica. Olson e Tkach (2005) discutem que espécies tidas como cosmopolitas podem na verdade representar complexos de espécies crípticas e apontam o uso de ferramentas moleculares como um dos principais avanços capazes de elucidar estas questões.

As análises filogenéticas da região ITS rDNA de espécies de Heterophyidae e Opisthorchiidae agruparam as espécies de Opisthorchiidae em um clado com alto suporte de 'bootstrap' (90%), mas as espécies de Heterophyidae foram agrupadas de maneira irregular em diferentes clados. O opisthorchiídeo *Euamphimerus pancreaticus* agrupou como um grupo irmão do

clado com espécies de *Procerovum* e *Haplorchis* mesmo que com baixo suporte estatístico. Thaenkham et al. (2012) encontrou uma topologia para a região ITS2 rDNA separando completamente Opisthorchiidae e Heterophyidae, diferente dos nossos resultados, no qual as duas famílias não estão completamente separadas. Essas diferenças nos resultados podem se dar pela inclusão em nossas análises de espécies não utilizadas naquele trabalho como por exemplo, *E. costaricensis*, *C. lingua* e *E. pancreaticus*. Nas análises para a região do mtDNA *cox-1*, *P. summa* agrupou com espécies de Opisthorchiidae num clado com 94% de 'bootstrap' o que sugere que a identificação deste espécime seja reavaliada.

Vanhove et al. (2013) e Besansky et al. (2003) discutiram o uso problemático de oligonucleotídeos generalistas para a região mtDNA *cox-1* em muitas famílias de Platyhelminthes, sugerindo o uso das regiões 28S rDNA e ITS rDNA como 'barcodes' mais confiáveis para o filo. Em nossos resultados obtivemos alta variabilidade para esta região o que talvez atrapalhe nas análises para taxas mais altas do que espécie ou gênero.

Olson & Tkach (2005) atestaram que em níveis taxonômicos inferiores, é problemático diferenciar espécies e gêneros em muitas famílias de Digenea, portanto as próprias famílias não apresentam uma separação morfológica clara. De acordo com nossos resultados fica claro que a separação de Heterophyidae e Opisthorchiidae ainda é difícil, mesmo com o uso de análises filogenéticas de regiões variáveis como ITS rDNA e mtDNA *cox-1*, onde as duas famílias não foram totalmente separadas e o suporte estatístico foi geralmente baixo para os grupos formados.

As novas técnicas de sequenciamento de genomas têm avançado rapidamente e genomas de trematódeos já se encontram disponíveis em bancos de dados biológicos de acesso público. Estudos com genomas mitocondriais têm evidenciado a estrutura e organização dos genomas fornecendo dados para o melhor entendimento de padrões e origens evolucionárias dos Digenea (Webster & Littlewood, 2012; Liu et al. 2014; Briscoe et al. 2016). Além disso estudos com genomas se mostram promissores no sentido de encontrar novas regiões

gênicas que sejam mais adequadas para a identificação de espécies crípticas e separação de taxa (Liu et al. 2014; Brabec et al. 2015; Briscoe et al. 2016).

Mesmo com tais avanços é importante lembrar que filogenias bem resolvidas serão geradas somente com a utilização de bancos de dados robustos e representativos das diversas espécies, sendo importantes também estudos que relacionem a morfologia dos Heterophyidae e seus ciclos de vida com a variabilidade genética do grupo.

Parte deste capítulo compõe o **Anexo 2**. Borges JN, Costa VS, Mantovani C, Barros E, Santos EGN, Mafra CL, Portes CP. Molecular characterization and confocal laser scanning microscopic study of *Pygidiopsis macrostomum* (Trematoda: Heterophyidae) parasites of guppies *Poecilia vivipara*. J F Dis In Press.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Parasitas com potencial zoonótico provenientes do pescado como os membros da família Heterophyidae têm ocorrência comum no leste e sudeste asiático causando infecções em humanos e problemas significativos em sistemas de criação de peixes. Representantes destes trematódeos ocorrem em diferentes regiões geográficas mas sua identificação baseada em dados morfológicos e moleculares, assim como dados de sua prevalência e intensidade ainda são escassos. Neste estudo foram realizados testes de viabilidade de metacercárias de Heterophyidae em um peixe da região Neotropical (tainha) e um peixe da região Neártica (bacalhau) além da caracterização genética de quatro espécies da família.

Estudos como este são importantes no intuito de gerar informação para a elaboração de novos métodos e ferramentas de diagnose específicas para estes parasitos com potencial zoonótico, especialmente para os estádios larvais. Auxiliam também a elucidar as relações filogenéticas entre espécies próximas.

As relações filogenéticas entre heterofiídeos e opistorchiídeos mostram uma grande proximidade entre as duas famílias, mas até o momento não foi possível separá-las filogeneticamente. O resultado observado neste trabalho evidencia a necessidade de mais estudos com diferentes espécies das duas famílias para a construção de filogenias mais robustas que possam ajudar a elucidar as relações evolutivas entre estes parasitos.

Neste trabalho foi possível evidenciar que metacercárias de Heterophyidae presentes na musculatura da tainha e do bacalhau representam moderado risco à saúde pública, sendo recomendável sempre consumir estes peixes cozidos ou congelá-los antes do consumo cru. Como dados do ciclo de vida de muitas espécies ainda são escassos, é difícil dizer quantas espécies de peixes de interesse comercial podem estar infectadas por metacercárias destes parasitos. Isso demonstra que mais informações sobre ciclos de vida, especialmente sobre peixes hospedeiros e o desenvolvimento de métodos que identifiquem/inativem estas metacercárias presentes no pescado são de suma importância.

7 CONCLUSÕES

- A viabilidade de metacercárias de *Ascocotyle (Phagicola) longa* de tainhas do Brasil foi testada e indicou um alto risco de infecção em humanos pelo consumo do peixe cru ou mal cozido, sendo altamente recomendável o congelamento dos peixes quando destinado ao consumo humano.
- A viabilidade de metacercárias de *Cryptocotyle lingua* de bacalhau da Dinamarca indica um alto risco de infecção em humanos porém a regulamentação para eliminação de parasitos vigente na União Européia e Estados Unidos é suficiente para inativar metacercárias desta espécie, fazendo com que a probabilidade de contaminação seja baixa. Baseados em nossos resultados recomendamos também o congelamento de bacalhau quando submetido a procedimentos de defumação a frio.
- O perfil genético de *Ascocotyle (Phagicola) longa* da Lagoa Rodrigo de Freitas apresentou grande homogeneidade genética, tendo sido apresentadas novas sequencias para a região 28S do rDNA.
- A comparação de *A. (P.) longa* com um espécime de Israel resultou em grande variabilidade genética, o que sugere a existência de espécies crípticas.
- O perfil genético de *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* da Lagoa Rodrigo de Freitas foi avaliado com novas sequencias das regiões 18S, 28S e ITS2 do rDNA e mtDNA *cox-1* e apresentou grande homogeneidade genética.
- O perfil genético de *Pygidiopsis macrostomum* da Lagoa Rodrigo de Freitas foi avaliado com novas sequencias das regiões 18S, 28S e ITS2 do rDNA e mtDNA *cox-1*. As sequências da região ITS2 rDNA apresentaram grande variabilidade genética, sendo necessários mais estudos para elucidar a ocorrência de espécies crípticas.
- Este foi o primeiro estudo por microscopia de varredura a laser confocal realizado em *Pygidiopsis macrostomum*.
- Novos dados genéticos de *Cryptocotyle lingua* incluíram sequências da região ITS2 rDNA.

8 REFERÊNCIAS

Al-Kandari WY, Alnaqeeb MA, Isaac AM, Al-Bustan SA. Molecular characterization of *Stictodora tridactyla* (Trematoda: Heterophyidae) from Kuwait Bay using rDNA ITS and mtCO1. *Parasitol Res* 2015; 114 (11): 4259-4266.

Alda P, Bonel N, Panei CJ, Cazzaniga NJ, Martorelli SR. First molecular identification of *Ascocotyle (Phagicola) longa* in its first intermediate host the mud snail *Heleobia australis*. *Acta Parasitol* 2015; 60 (4): 791-795.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 1990; 15 (3): 403-410.

Antunes, SA, Almeida-Dias, ER. *Phagicola longa* (Trematoda: Heterophyidae) em mugilídeos estocados resfriados e seu consumo cru em São Paulo, SP. *Hig Alim* 1994; 8: 41–42.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA-Brasil). Nota de esclarecimento sobre o consumo de pescado cru. [Nota na internet] Brasília 28/04/2005. Ministério da Saúde [acesso em 03/03/2016]. Disponível em: www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/peixe_cru2.pdf.

Babbott FL, Frye WW, Gordon JE. Intestinal parasites of man in Arctic Greenland. *Am J Tro Med Hyg* 1961; 10: 185-190.

Beldsoe GE, Oria MP. Potential hazard in cold-smoked fish: parasites. *J Food Sci Sup* 2001; 66: S1100-S1103.

Besansky NJ, Severson DW, Ferding MT. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. *Trends in Parasitology* 2003, 19: 545–546.

Billings AN, Teltow GJ, Weaver SC, Walker DH. Molecular characterization of a novel *Rickettsia* species from *Ixodes scapularis* in Texas. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(2): 305-9.

Blair D, McManus DP. Restriction enzyme mapping of ribosomal DNA can distinguish between fasciolid (liver fluke) species. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 36: 201–208.

Blair D, Campos A, Cummings MP, Lacleste JP. Evolutionary Biology of Parasitic Platyhelminths: The Role of Molecular Phylogenetics. *Parasitol Today*. 1996; 12: 66-71.

Bowles J, Hope M, Tiu WU, Xushian L, McManus DP. Nuclear and mitochondrial genetic markers highly conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*. *Acta Trop* 1993; 55: 217–229.

BRASIL. Decreto nº 30691, de 07 de julho de 1952. Aprova o Novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal). *Diário Oficial da União* 07 jul 1952; 155 (1): 1-42.

Brabec J, Kostadinova A, Scholz T, Littlewood DTJ. Complete mitochondrial genomes and nuclear ribosomal RNA operons of two species of *Diplostomum* (Platyhelminthes: Trematoda): a molecular resource for taxonomy and molecular epidemiology of important fish pathogens. *Parasit Vectors* 2015; 8: 336

Bray RA. Superfamily Opisthorchioidea. In: Bray RA, Gibson DI, Jones A. Keys to the Trematoda. Vol 3. Wallingford: CAB International and Natural History Museum. 2008; p. 7-8.

Briscoe AG, Bray RA, Brabec J, Littlewood DTJ. The mitochondrial genome and ribosomal operon of *Brachycladium goliath* (Digenea: Brachycladiidae) recovered from a stranded minke whale. *Parasitol Int* 2016; 65: 271-275.

Brusentsov II, Katokhin AV, Brusentsova IV, Shekhovtsov SV, Borovikov SN, Goncharenko GG, Lider LA, Romashov BV, Rusinek OT, Shibitov SK, Suleymanov MM, Yevtushenko AV, Mordvinov VA. Low Genetic Diversity in Wide-Spread Eurasian Liver Fluke *Opisthorchis felineus* Suggests Special Demographic History of This Trematode Species. *Plos One* 2013; 8: e62453.

Buchmann K. Prevalence and intensity of infection of *Cryptocotyle lingua* (Creplin) and *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi) parasitic metacercariae of Baltic cod (*Gadus morhua* L.). Nord Vet Med 1986; 38: 303-307.

Chai JY, Murrell KD, Lymbery AL. Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues. Int J Parasitol 2005; 35: 1233–1254.

Chieffi PP, Leite OH, Dias RM, Torres DM, Mangini AC. Human parasitism by *Phagicola* sp (Trematoda, Heterophyidae) in Cananéia, São Paulo state, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1990; 32: 285-288.

Chieffi PP, Gorla MC, Torres DM, Dias RM, Mangini AC, et al. Human infection by *Phagicola* sp. (Trematoda, Heterophyidae) in the municipality of Registro, São Paulo State, Brazil. J Trop Med Hyg. 1992; 95: 346-348.

Cho YJ, Chu JP, Rim HJ, Hwang SK. Viability of *Clonorchis sinensis* metacercaria according to the food-processing methods. J Infect Chemot 2002; 34, 242-247.

Chontanarith T, Wongsawad C, Chomdej S, Krailas D, Chai JY. Molecular phylogeny of trematodes In Family Heterophyidae based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (mCO I). Asian Pac J Trop Med 2014; 14: 443-450.

Christensen N, Roth H. Investigations in gastrointestinal parasites of cats. Kongelige Veterinær og Landbohøjskole Aarsskrift 1946; 114-144.

Christensen N, Roth H. Investigations on internal parasites of dogs. Kongelige Veterinær og Landbohøjskole Aarsskrift 1949; 1-73.

Clausen JH, Madsen H, Van PT, Dalsgaard A, Murrell KD. Integrated parasite management: path to sustainable control of fishborne trematodes in aquaculture. Trends Parasitol 2015; 31: 1.

Conceição JCS, São Clemente SC, Matos E. Ocorrência de *Phagicola longus* (Ransom, 1920) Price, 1932 em tainhas (*Mugil* sp.) comercializadas em Belém. Estado do Pará. Rev. Ciênc. Agrár. 2000; 33: 97–101.

Cribb TH, Bray RA, Littlewood DTJ. The nature and evolution of the association among digeneans, molluscs and fishes. *Int J Parasitol* 2001; 31: 997-1011.

Cribb TH, Bray RA, Olson PD, Littlewood DTJ. Life Cycle Evolution in the Digenea: a New Perspective from Phylogeny. *Adv Parasitol* 2003; 54: 197-254.

Czubaj A, Niewiadomska K. The muscular system of the cercaria of *Diplostomum pseudospathaceum* Niew 1984 (Digenea): A phalloidin-rhodamine fluorescence and TEM study. *Acta Parasitol* 1997, 42: 199–218.

Day TA, Bennett JL, Pax RA. Serotonin and its requirement for maintenance of contractility in muscle fibers isolated from *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 1994, 108: 425–432.

Dronen NO, Blend CK, Davis AJ. Emendation of the subfamily Caliguirinae and Pygidiopsinae (Digenea) with a redescription of *Caiguiria anterouteria* (Digenea: Heterophyidae) and reassignment of *Pygidiopsis crassus* to *Caiguiria*. *Zootaxa* 2004; 417:1–12.

Dung DT, Hop NT, Thaenkham U, Waikagul J. Genetic differences among Vietnamese *Haplorchis taichui* populations using the COI genetic marker. *J Helminthol*. 2013; 87: 66-70.

Dzikowski R, Levy MG, Poore MF, Flowers JR, Paperna I. Use of rDNA polymorphism for identification of Heterophyidae infecting freshwater fishes. *Dis Aquat Org* 2004; 59: 35-41.

EFSA (European Food Safety Authority). Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal*. 2010; 8: 1543.

EFSA (European Food Safety Authority) anonymous. Regulation (EC) N_853/2004 of the European parliament and council of 29 of April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. 2004. Acessado 19.03.16. Disponível em https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Food_Business/Reg853_2004.pdf.

Fairweather I, Skuce PJ. Flatworm neuropeptides - present status, future directions. *Hydrobiologia* 1995, 305: 309–316.

Fan, PC. Viability of metacercariae of *Clonorchis sinensis* in frozen or salted freshwater fish. *Int J Parasitol* 1998; 28: 603-605.

FDA (U.S. Food and Drug Administration). Fish and fishery products hazards and controls guidance. 4 ed. Gainesville: University of Florida. 2011.p. 470.

Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Biol Evol* 1981; 17: 368–376.

Fletcher M, Woodruff DS, LoVerde PT, Asch HL. Genetic differentiation between *Schistosoma mekongi* and *S. japonicum*: an electrophoretic study. *Malacol Rev Suppl* 1980; 2: 113–122.

Fried B, Graczyk TK, Tamang L. Food-borne intestinal trematodiasis in humans. *Parasitol Res* 2004; 93: 159–170.

Fried B, Abruzzi A. Food-borne trematode infections of humans in the United States of America. *Parasitol Res* 2010; 106: 1263-1280.

Galazzo DE, Dayanandan S, Marcogliese DJ, McLaughlin JD. Molecular systematics of some North American *Diplostomum* (Digenea) based on rDNA-sequence data and comparisons with European congeners. *Can J Zool* 2002; 80: 2207- 2217.

Gibson, DI. Class Trematoda Rudolphi, 1808. In: Gibson DI, Jones A., Bray RA, Keys to the Trematoda. Vol 1. Wallingford: CAB International and Natural History Museum. 2002; p. 1-3.

Guildal JA. Investigations on the endoparasitic fauna of the Scandinavian-Baltic population of the black-headed gull (*Larus ridibundus* L.). *Kongelige Veterinær og Landbohøjskole Aarsskrift* 1968; 59-78.

Halton DW, Gustafsson MKS. Functional morphology of the platyhelminth nervous system. *Parasitology* 1996; 113: S47–S72.

Hamed MGE, Elias AN. Effect of food-processing methods upon survival of the trematode *Heterophyes* sp. in flesh of mullet caught from brackish Egyptian waters. J Food Sci 1970; 35: 386e388.

Hillis DM e Dixon MT. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. Quart Rev Biol 1991; 66: 411-466.

Hinrich J, Schulenburg GVD, Englisch U, Wägele JW. Evolution of ITS1 rDNA in the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda): 3'End Sequence Conservation and ITS Phylogenetic Utility. J Mol Evol 1999; 48:2–12.

Jägerskiöld LA. *Distomum lingua* Crepelin, ein Genitalnapftragendes *Distomum*. Bergen Mus Aarb 1899; 2: 1-16.

Kaukas A, Neto ED, Simpson AJG, Southgate VR Rollinson D. A phylogenetic analysis of *Schistosoma haematobium* group species based on randomly amplified polymorphic DNA. Int J Parasitol 1994; 24: 285–290.

Køie M. Digenetic trematodes from *Gadus morhua* L. (Osteichthyes, Gadidae) from Danish and adjacent waters, with special reference to their life-histories. Ophelia 1984; 23: 195-222.

Králová-Hromadová I, Špakulová M, Horáčková E, Turčeková L, Novobilský A, Beck R, Koudela B, Marinculić A, Rajský D, Pybus M. Sequence analysis of ribosomal and mitochondrial genes of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae): intraspecific variation and differentiation from *Fasciola hepatica*. J Parasitol 2008; 94: 58-67.

Kristoffersen R. A new species of parasite on Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), in seawater cages in Scandinavia. Aquaculture 1988; 71: 187-191.

La Rue GR. The Classification of Digenetic Trematoda: A Review and a New System. Exp Parasitol 1957; 6: 306-349.

Lambert WJ, Corliss E, Sha J, Smalls J. Trematode infections in *Littorina littorea* on the New Hampshire coast. Northeastern Naturalist 2012; 19: 461-474.

Lee D, Choe S, Park H, Jeon H, Chai J, Sohn W, Yong T, Min D, Rim H, Eom K. Complete Mitochondrial Genome of *Haplorchis taichui* and Comparative Analysis with Other Trematodes. *Korean J Parasitol* 2013; 51: 719-726.

Leksomboon R, Chaijaroonkhanarak W, Arunyanart C, Umka J, Jones MK, Sripa B. Organization of the nervous system in *Opisthorchis viverrini* investigated by histochemical and immunohistochemical study. *Parasitol Int* 2012; 61: 107–111.

Levy MG, Flowers JR, Poore MF, Khoo L, Pote LM, Mullen JE, Paperna I, Dzikowski R, Litaker RW. Morphologic, pathologic, and genetic investigations of *Bolbophorus* spp. (Diplostomatida, Trematoda) affecting cultured *Ictalurus punctatus* in the Mississippi Delta. *J Aquat Anim Health* 2002; 14: 235–246.

Linton E. *Tocotrema lingua* (Crepelin), the adult stage as a skin parasite of the cunner and other fishes of the Woods Hole region. *J Parasitol* 1915; 1: 128-134.

Liu G, Gasser RB, Young ND, Song H, Ai L, Zhu X. Complete mitochondrial genomes of the 'intermediate form' of *Fasciola* and *Fasciola gigantica*, and their comparison with *F. hepatica*. *Parasit Vector* 2014; 7: 150

Lysne DA, Hemmingsen W, Skorping A. The distribution of *Cryptocotyle* spp. Metacercariae in the skin of caged Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J Fish Biol* 1994; 45: 352-355.

MacLean JD, Cross JH, Mahanty S. Liver, lung and intestinal fluke infections in: RL Guerran, DH Walker, PF Weller. *Tropical Infectious Diseases*, vol. II. Philadelphia: Churchill Livingstone 1999; pp. 1039–1057

Magee RM, Fairweather I, Johnston CF, Halton DW, Shaw C. Immunocytochemical demonstration of neuropeptides in the nervous system of the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea). *Parasitology* 1989, 98: 227–238.

Mair GR, Maule AG, Shaw C, Halton DW. Muscling in on parasitic flatworms. *Parasitol Today* 1998; 14: 73–76.

Mair GR, Maule AG, Day TA, Halton DW. A confocal microscopical study of the musculature of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 2000; 121: 163–170.

Martorelli SR, Lino A, Marcotegui P, Montes MM, Alda P, Panei CJ. Morphological and molecular identification of the fish-borne metacercária of *Ascocotyle (Phagicola) longa* Ranson, 1920 in *Mugil liza* from Argentina. *Vet Parasitol* 2012; 190: 599-603.

Marty AM, Andersen EM. Fasciolopsiasis and other intestinal trematodiasis. *Pathol Inf Dis* 2000; 1: 93–105

Maule AG, Day TA, Chappel LH. Parasite Neuromusculature and its Utility as a Drug Target *Parasitology supplement vol 131*. Cambridge: Cambridge University Press. 2005; 190 p.

Mellegaard S, Lang T. Diseases and parasites of Baltic cod (*Gadus morhua*) from the Mecklenburg Bight to the Estonian coast. *ICES J Mar Sci* 1999; 56: 154-158.

Miller TL, Cribb TH. Two new cryptogonimid genera *Beluesca* n. gen. and *Chelediadema* n. gen. (Digenea: Cryptogonimidae) from tropical Indo-West Pacific Haemulidae (Perciformes). *Zootaxa* 2007; 1543: 45-60.

Ministério da Saúde. Classificação de Risco dos Agentes Biológicos, Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília; 2010.

Moraes IR. Estudo comparativo da sensibilidade de cistos de metacercárias de *Phagicola faust*, 1920 (Trematoda: Heterophyidae) à radiação ionizante e ao congelamento em peixes crus preparados a partir de tainha *Mugil linnaeus*, 1758 (pisces: mugilidae). Tese [Doutorado em Tecnologia Nuclear - Aplicações] – Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares - USP; 2005.

Nolan MJ, Cribb TH. The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. *Adv Parasitol* 2005; 60:101-63.

O'Grady RT. Ontogenetic sequences and the phylogenetics of parasitic flatworm life cycles. *Cladistics*. 1985; 1: 159-170.

Odening K. Verwandtschaft, System und zyklontogenetische Besonderheiten der Trematoden. Zoologische Jahrbücher. Systematik. 1974; 101: 345-396.

Okumura MPM, Pérez ACA, Filho AE. Principais zoonoses parasitárias transmitidas por pescado – Revisão. Revista de Educação Continuada CRMV-SP 1999; 2 (2): 066-080.

Oliveira SA, Blazquez FJH, Antunes SA, Maia AAM. Metacercárias de *Ascocotyle (Phagicola) longa* Ransom, 1920 (Digenea: Heterophyidae), em *Mugil platanus*, no estuário de Cananéia, SP, Brasil. Cienc Rural 2007; 37 (4): 1056-1059.

Olson PD, Cribb TH, Tkach VV, Bray RA, Littlewood DTJ. Phylogeny and Classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). Int J Parasitol 2003; 33: 733-755.

Olson PD, Tkach VV. Advances and Trends in the Molecular Systematics of Parasitic Platyhelminthes. Adv Parasitol 2005; 60, 165-243.

Pauly A, Schuster R, Steuber S. Molecular characterization and differentiation of opisthorchiid trematodes of the species *Opisthorchis felinus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1790) using polymerase chain reaction. Parasitol Res 2003; 90: 409–414.

Pearson J. Family Heterophyidae. In: Bray RA, Gibson DI, Jones A. Keys to the Trematoda. Vol 3. Wallingford: CAB International and Natural History Museum. 2008; p. 113 -142.

Pérez ACA, Machado TM, Lopes RG, Okumura MPM, Rodrigues MV, Corrêa AM, Montano AP, São Clemente SC. Aspectos parasitológicos do pescado comercializado na costa da mata Atlântica. Hig Aliment 2012, 26: 120-124.

Pornruseetairatn S, Kino H, Shimazu T, Nawa Y, Scholz T, Ruangsittichai J, Saralamba NT, Thaenkham U. A molecular phylogeny of Asian species of the genus *Metagonimus* (Digenea) -small intestinal- flukes based on representative Japanese populations. Parasitol Res 2015; 115 (3): 1123-1130.

Posada D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 2008; 25 (7): 1253–1256.

Prasongwatana J, Laummaunwai P, Boonmars T, Pinlaor S. Viable metacercariae of *Opisthorchis viverrini* in northeastern Thai cyprinid fish dishes as part of a national program for control of *O. viverrini* associated cholangiocarcinoma. *Parasitol Res* 2012; 112: 1323-1327.

Rausch RL, Scott EM, Rausch VR. Helminths in eskimos in western Alaska, with particular reference to *Diphyllobothrium* infection and anemia. *T Roy Soc Trop Med Hyg* 1967; 61: 351-357.

Rees FG. The Ultrastructure, Development and Mode of Operation of the Ventrogenital Complex of *Cryptocotyle lingua* (Creplin) (Digenea: Heterophyidae). *P Roy Soc Lond B Bio* 1978; 200: 1140

Rhode K. Phylogeny of Platyhelminthes, with special reference to parasitic groups. *Int J Parasitol* 1990; 20: 979- 1007.

Rodrigues MV, Pérez ACA, Machado TM, Orisaka FM, Kurissio JK, Lafisca A. Research of *Ascocotyle (Phagicola) longa* in Heat Treated Fillets of Mullet (*Mugil platanus*). *Fish Aquac J* 2015; 6: 1000115.

Santos CP, Lopes KC, Costa VS, Santos EGN. Fish-borne trematodosis: Potential risk of infection by *Ascocotyle (Phagicola) longa* (Heterophyidae). *Vet Parasitol* 2013; 193: 302– 306.

Saeed I, Maddox-Hyttel C, Monrad J, Kapel CMO. Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Vet Parasitol* 2006; 139: 168-179.

Scholz T. Taxonomic study of *Ascocotyle (Phagicola) longa* Ransom, 1920 (Digenea: Heterophyidae) and related taxa. *Syst Parasitol* 1999; 43: 147-158.

Šebelová S, Stewart MT, Mousley A, Fried B, Marks NJ, Halton DW. The musculature and associated innervation of adult and intramolluscan stages of *Echinostoma caproni* (Trematoda) visualized by confocal microscopy. *Parasitol Res* 2004; 93: 196–206.

Simões SBE. Heterophyidae (Trematoda: Digenea) de *Poecilia vivipara* Bloch & Schneider, 1801 (Osteichthyes) da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, RJ: Taxonomia, ultraestrutura e infecções experimentais. Rio de Janeiro [Dissertação de mestrado em Biologia Parasitária] - Instituto Oswaldo Cruz; 2005.

Simões SBE, Barbosa HS, Santos CP. Redescription and surface ultrastructure of *Pygidiopsis macrostomum* (Digenea: Heterophyidae). *J Parasitol* 2005; 91: 931–936.

Simões SBE, Scholz T, Barbosa HS, Santos C.P. Taxonomic status, redescription, and surface ultrastructure of *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* n. comb. (Digenea: Heterophyidae). *J Parasitol*. 2006; 92: 501–508.

Simões SBE. Ciclos evolutivos de Opisthorchioidea Looss, 1899 (Trematoda: Digenea) da Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz; 2009.

Simões SBE, Barbosa HS, Santos C.P. The life history of *Pygidiopsis macrostomum* Travassos, 1928 (Digenea: Heterophyidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 106–111.

Simões SBE, Barbosa HS, Santos C.P. The life cycle of *Ascocotyle (Phagicola) longa* (Digenea: Heterophyidae), a causative agent of fish-borne trematodosis. *Acta Trop* 2010; 113: 226-233.

Skov J, Kania PW, Dalsgaard A, Jogersen TR, Buchmann K. Life cycle stages of heterophyid trematodes in Vietnamese freshwater fishes traced by molecular and morphometric methods. *Vet Parasitol* 2009; 160: 66–75.

Smyth JD, Halton DW. The physiology of trematodes 2^a ed. Cambridge: Cambridge University Press 1983; 446p.

Sohn WM, Kim DG, Jung BK, Cho J, Chai JY. *Pygidiopsis cambodiensis* n. sp. (Digenea: Heterophyidae) from experimental hamsters infected with metacercariae in mullets from Cambodia. *Parasitol Res* 2016; 115: 123-130.

Stewart MT, Mousley A, Koubková B, Sebelová S, Marks NJ, Halton DW. Gross anatomy of the muscle systems and associated innervation of *Apatemon cobitidis proterorhini* metacercaria (Trematoda: Strigeidea), as visualized by confocal microscopy. *Parasitology* 2003, 136: 273–282.

Stitt AW, Fairweather I, Trudgett AG, Johnston CF. *Fasciola hepatica*: localization and partial characterization of tubulin. *Parasitol Res* 1992, 78:103–107.

Stunkard HW. The excretory system of *Cryptocotyle* (Heterophyidae). *J Parasitol* 1929, 15: 259-267.

Stunkard HW. The life history of *Cryptocotyle lingua* (Creplin), with notes on the physiology of the metacercariae. *J Morphol Physiol* 1930; 50: 143-191.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Bio Evol* 2011; 28(10): 2731–2739.

Terenina NB, Kreshchenko ND, Chilyuta NV, Zaripova FF. Serotonin and Neuropeptide FMRFamide in the Nervous System of *Opisthioglyphe ranae* (Trematoda: Plagiorchiidae). An Immunocytochemical Study. *J Evol Biochem Physiol* 2015; 51, 145–151.

Thaenkham U, Dekumyoy P, Komalamisra C, Sato M, Dung DT, Waikagul J. Systematics of the subfamily Haplorchiinae (Trematoda: Heterophyidae), based on nuclear ribosomal DNA genes and ITS2 region. *Parasitol Int* 2010; 59: 460-465.

Thaenkham U, Phuphisut O, Pakdee W, Homsuwan N, Sa-nguankiat S, Waikagul J, Nawa Y, Dung DT. Rapid and simple identification of human

pathogenic heterophyid intestinal fluke metacercariae by PCR-RFLP. *Parasitol Int* 2011a; 50: 503-506.

Thaenkham U, Nawa Y, Blair D, Pakdee W. Confirmation of the paraphyletic relationship between families Opisthorchiidae and Heterophyidae using small and large subunit ribosomal DNA sequences. *Parasitol Int* 2011b; 60: 521-523.

Thaenkham U, Blair D, Nawa Y, Waikagul J. Families Heterophyidae and Opisthorchiidae: Are they distinct? *Parasitol Int* 2012; 61: 90-93.

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

Threadgold LT. Parasitic Platyhelminthes. In: Bereiter-Hahn J, Matoltsy AG, Richards KS. *Biology of the tegument. Vol. 1 Invertebrates*. Berlin: Springer-Verlag pp. 1984; 132–211.

Taraschewski H. Heterophyiasis, an intestinal fluke infection of man and vertebrates transmitted by euryhaline gastropods and fish. *Helgoländer* 1984; 37: 463-478.

Tkach VV, Pawlowski J, Mariaux J. Phylogenetic analysis of the suborder Plagiorchiata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial *18S*rDNA sequences. *Int J Parasitol* 2000; 30: 83-93.

Tkach VV, Littlewood DTJ, Olson PD, Kinsella JM, Swiderski Z. Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). *Syst Parasitol* 2003; 56: 1–15.

Toledo R, Esteban JG, Fried B. Current status of food-borne trematode infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 1705-1718.

Travassos L. Informações sobre alguns Heterophyidae dos animais domésticos do Brasil. *Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo* 1928; 3: 1–4.

Van Herwerden L, Blair D, Agatsuma T. Intra- and Interindividual Variation in ITS1 of *Paragonimus westermani* (Trematoda: Digenea) and Related Species: Implications for Phylogenetic Studies. *Mol Phylogenet Evol* 1999; 12 (1): 67-73.

Vanhove MPM, Tessens B, Schoelinck C, Jondelius U, Littlewood DTJ, Artois T, Huyse T. Problematic barcoding in flatworms: A case-study on monogeneans and rhabdocoels (Platyhelminthes). *ZooKeys* 2013, 365: 355–379.

Webster BL, Littlewood DTJ. Mitochondrial gene order change in *Schistosoma* (Platyhelminthes: Digenea: Schistosomatidae). *Int J Parasitol* 2012; 42: 313-321.

Williams HH, Jones A, Crompton DWT. Parasitic worms of fish. No. 04. London: Taylor & Francis, 1994.

Wintenberg G. Studies on the trematode family Heterophyidae. *Annals of Trop Med Parasitol* 1929; 23: 131-239.

Yamaguti S. Synopsis of Digenetic Trematodes of Vertebrates. Vol I. Tokyo: Keigaku Publishing Co. 1971; p. 1074.

Yamaguti S. A synoptical review of life histories of digenetic trematodes of vertebrates. Tokyo: Keigaku Publishing Co. 1975; p. 590.

Zdzitowiecki K, Rutkowska MA. The helminthofauna of bats (Chiroptera) from Cuba. III. A review of trematodes. *Acta Parasitol Pol* 1980; 26 (19): 201-214.

ANEXOS

ANEXO I

Artigo publicado na Revista Food Control

Food Control 50 (2015) 371–377



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont



Viability of *Cryptocotyle lingua* metacercariae from Atlantic cod (*Gadus morhua*) after exposure to freezing and heating in the temperature range from $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $100\text{ }^{\circ}\text{C}$



Juliana N. Borges ^{a,*}, Jakob Skov ^b, Qusay Z.M. Bahlool ^b, Ole S. Møller ^b, Per W. Kania ^b, Cláudia P. Santos ^a, Kurt Buchmann ^b

^a Post-Graduation Program in Biodiversity and Health, Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Focruz, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro 21040-360, Brasil

^b Department of Veterinary Disease Biology, Faculty Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Stibøjlen 7, Frederiksberg C DK-1870, Denmark

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2014

Received in revised form

14 September 2014

Accepted 15 September 2014

Available online 22 September 2014

Keywords:

Trematode

Food safety

Temperature

Fish

ABSTRACT

The presence of parasites in fish products is a problem that concerns consumers and authorities due to the potential hazards it may cause. The majority of studies on the viability of parasites in marine fish products currently focus on nematodes of the family Anisakidae whereas only few are concerned with trematodes. In this study on the heterophyid trematode *Cryptocotyle lingua* (identified by morphometric and molecular techniques) we isolated metacercariae from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and incubated the parasites in cod muscle tissue at different temperatures ranging from $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ and subsequently tested their viability. SEM images were made to assess the physical damage caused to parasites exposed to different temperatures. Temperatures between $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ and between $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ killed the metacercariae present in fish flesh in less than 2 h. Controls kept at $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ survived for nine days. Extreme freezing temperatures caused minimal visual physical damage to cysts, but the tegument of metacercariae was severely affected at all temperatures when incubated for long periods.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Concerns with the quality and safety of fish products are growing among consumers and legislators (FAO, 1998; Huss, Ababouch, & Gram, 2003) but global changes in the way consumers perceive quality have led to introduction of dishes based on inadequately processed fish products. This, however, increases the risk of obtaining food-borne diseases including parasitoses (Grunert, 2005; Orlandi, Chu, Bier, & Jackson, 2002; Portes Santos, Lopes, Costa, & Santos, 2013). Among these are infections caused by nematodes (Audicana & Kennedy, 2008) but also fish-borne trematode infections are known to affect about 40 million people worldwide. Trematodes in fish reported as human health hazards comprise metacercariae within the families Heterophyidae, Echinostomatidae and Opisthorchiidae (Abdussalam, Käferstein, &

Mott, 1995; Fried, Graczyk, & Tamang, 2004; Healy, 1970). Many of the human cases have been reported from Asia where a number of studies have focused on the biology and control (including food processing technology) of several of the endemic representatives within these taxa such as species of *Clonorchis* and *Opisthorchis*. Our knowledge on similar aspects of parasites from temperate and Arctic regions, such as the heterophyid fluke *Cryptocotyle lingua*, is on the other hand far from complete. Snails of the genus *Littorina* act as first intermediate hosts (Lambert, Corliss, Sha, & Smalls, 2012; Mattheus, Montgomery, & Hanna, 1985) and a wide range of teleost fish species act as second intermediate hosts (van den Broek, 1979; Stunkard, 1929). Fish species reported with *C. lingua* infections in Scandinavian waters include Atlantic cod (Buchmann, 1986; Hemmingsen, Lombardo, & MacKenzie, 1991; Heuch et al., 2011; Køie, 1984; Mellegaard & Lang, 1999), dab *Limanda limanda* (Køie, 1983), three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* (Barber, 2003), Arctic char, *Salvelinus alpinus* (Kristoffersen, 1988) and herring *Clupea harengus* (Tolonen & Karlsbakk, 2003). The adult form is found in the intestine of fish eating birds (Guildal, 1968) but there are reports of adult *C. lingua* infecting mammals such as foxes (Saeed, Maddox-Hyttel, Monrad, & Kapel, 2006), dogs (Christensen

* Corresponding author. Tel.: +55 021 25621638.

E-mail addresses: juliananovo@ioc.fiocruz.br, juliananovo@bol.com.br, julino@gmail.com (J.N. Borges), jask@sund.ku.dk (J. Skov), vfk472@alumni.ku.dk (Q.Z.M. Bahlool), osmolier@gmail.com (O.S. Møller), pwk@sund.ku.dk (P.W. Kania), cpsantos@ioc.fiocruz.br (C.P. Santos), kub@sund.ku.dk (K. Buchmann).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.021>

0956-7135/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

& Roth, 1949) and cats (Christensen & Roth, 1946). Human infections have been reported from Greenland and Alaska (Babbott, Frye, & Gordon, 1961; Rausch, Scott, & Rausch, 1967). Despite the documented ability of the parasite to infect mammals and humans no studies have been carried out on how food processing techniques affect viability of these metacercariae. In order to provide consumers with safer food products, legislators have provided specific procedures on processing and treatment of fish products in order to avoid parasites (EFSA, 2004, 2010; Huss et al., 2003). However, the current legislation is based on studies on species from other geographic regions (Egypt, China, Thailand and Russia) (Fan, 1998; Fattakhov, 1989; Hamed & Elias, 1970; Kruatrachue, Chitramvong, Upathan, Vichary, & Viyanant, 1982; Tesana, Kaewkes, & Phinlaor, 1986). This calls for investigations into effects of heating or freezing techniques on survival of metacercariae from North-European waters. We have therefore performed a controlled study to describe the lethal effect of cold and heat exposure (temperatures ranging from -80 °C to 100 °C) on *C. lingua* metacercariae from Atlantic cod.

2. Material and methods

2.1. Fish

Atlantic cod (*Gadus morhua*) (N = 25) freshly caught in Danish waters were obtained from a local fish monger in Copenhagen. Fish had a mean weight (gutted) of 2.074 (SD 0.513) kg, and a mean total length of 63.4 (SD 6.2) cm.

2.2. Site of metacercariae in cod skin and fillet layers

The cod musculature was removed from the fish skeleton and the two fillets recovered from each fish were skinned. A longitudinal sagittal section divided the fillet into the outer and inner fillet layers, each with a thickness of approximately 1 cm. In order to determine site and parasite density in cod skin and the underlying outer/inner muscle layers similarly sized pieces of the skin, outer muscle and inner muscle of seven cod were measured, weighed and then digested as described in Section 2.4. The musculature

used was the part between the neck and the posterior end of the first dorsal fin, and the dorsal midline and the lateral line, which is the most heavily infected part of the skin/musculature (Lysne, Hemmingsen, & Skorping, 1994). The isolated metacercariae of each sample were counted and used to make an estimation of the number of metacercariae per gram of muscle/skin or per area of the skin.

2.3. Artificial digestion

Cod skin or musculature samples (a maximum of 50 g) were digested in standardized volumes (500 mL) of pepsin solution (1 L tap water, 6 mL HCl (≥37%), 9 g NaCl, 10 g pepsin (2000 FIP u/g)) in 1 L glass beakers (Ø = 95 mm) and magnetic stirring (200 rpm, magnet L = 40 mm) at 37 °C for 2 h. Digested samples were poured through a 50 µm sieve and isolated metacercariae were collected by flushing with saline (0.9% NaCl) and stored in phosphate buffered saline (PBS) (pH 6.2) until further use. In order to produce a standard population of encysted metacercariae for subsequent studies, a pool of metacercariae (>2000 specimens) collected from 3 individual cod was prepared in a Petri dish.

2.4. Incubation of isolated metacercariae in fillet sandwiches at various temperatures

Twenty isolated metacercarial cysts were mounted in fillet sandwiches i.e. parasites were pipetted between two fillet slices (each measuring 24 × 24 × 2–3 mm) of parasite-free cod muscle tissue and placed in Petri dishes (Ø = 60 mm) for incubation at different temperatures ranging from -80 °C to 100 °C (Table 1a). Duration of incubation (i.e. sampling time points) ranged from 1 min to 10 days dependent on the temperature (see Table 1a). All incubations were performed in triplicate. Petri dishes prepared for low incubation temperatures (<0 °C) were incubated without lid. Petri dishes prepared for high incubation temperatures (>0 °C) were supplied with 500 µL of deionized water and a lid in order to avoid desiccation. Subsequent to incubation, metacercariae were collected and their viability assessed.

Table 1

1a and 1b. Mean number (i.e. mean of triplicates of 10 metacercariae each) of dead metacercariae at different sampling time points and temperatures. Red coloration indicates death of all metacercariae. (1a) Metacercariae were isolated by pepsin digestion and mounted between cod tissue slices prior to incubation. (1b) Metacercariae were kept *in situ* as infections in cod tissue during incubation.

1a																								
Temperature °C	Sampling time points						Hours						Days											
	1	5	10	15	20	30	1	2	3	4	6	12	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
100	0.0	0.3	10.0	10.0	10.0	10.0																		
90	0.0	0.3	2.0	10.0	10.0	10.0																		
80	0.0	0.0	5.3	10.0	10.0	10.0																		
70	-	0.0	0.7	10.0	10.0	10.0	10.0																	
60	-	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	10.0	10.0																
50	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	10.0	10.0														
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	8.0	9.0	8.3	10.0		
-20	-	-	-	-	-	0.0	8.7	10.0	10.0	-	-	10.0	10.0	10.0										
-40	-	-	-	0.3	-	4.0	10.0	10.0	10.0	10.0														
-60	-	0.0	0.0	0.0	2.5	10.0	10.0	10.0																
-80	0.0	0.0	0.0	9.3	10.0	10.0																		

1b													
Temperature °C	Sampling time points						Hours						
	1	5	10	15	20	30	1	2	3	4	6	12	24
70	-	0.0	1.0	9.0	-	10.0	-	10.0					
60	-	0.0	0.0	3.7	3.7	10.0	10.0	10.0					
-20	-	-	-	-	-	0.0	8.3	9.7	-	-	10.0	10.0	10.0
-40	-	-	-	0.0	-	4.3	10.0	10.0	10.0				

2.5. Incubation of non-isolated metacercariae in situ in skin and musculature

Approx. 5 g of infected cod tissue (skin including 4–6 mm of underlying muscle tissue) from three different cod were placed in Petri dishes and incubated at selected temperatures for different time periods (Table 1b). All incubations were made in triplicate. Deionized water and lid was applied as described above (2.5).

2.6. Recovery of metacercariae from incubated cod tissue

After incubation (according to 2.6), each sample (approx. 5 g) was digested in standardized volumes (80 mL) of pepsin solution (see 2.4) in 100 mL glass beakers ($\varnothing = 50$ mm) and magnetic stirring (300 rpm, magnet $L = 30$ mm) at 37 °C for 1 h. Digested samples were poured through a 50 μ m sieve and isolated metacercariae were collected by flushing with saline (0.9% NaCl), placed in PBS (pH 6.2) and their viability tested.

2.7. Assessment of viability

Ten metacercariae recovered from each sample were transferred to 1 mL of 0.25% porcine trypsin (13,000–20,000 BAEE units/mg) (Sigma–Aldrich, Denmark) in PBS (pH 7.4) at room temperature (24 ± 1 °C) for no more than 1 h. To check the viability of metacercariae, the excysted parasites that were not moving were stained in a 1:1 solution of PBS (pH 7.4) and 0.4% Trypan Blue (Gibco, Scotland) for at least 3 min. Excysted metacercariae were considered dead when they stained by Trypan Blue. The same criteria could not be applied to non-excysted specimens, since Trypan Blue stains the cyst wall of both dead and live metacercariae. The viability of the cysts was in this case determined by assessing the amount of change in general morphology with brownish coloration and fading of morphological features indicating death (Fig. 1A). In this paper we refer to excystment as both: the active process by which a live metacercaria emerge from its cyst at favorable conditions and the release of the dead worm after a digestion of the cyst. All metacercariae were stored in 96% ethanol. Ten untreated metacercariae were excysted in triplicate as positive controls and stored in 96% ethanol for further use in molecular identification. Pilot trials showed that the viability of *C. lingua* metacercariae was not compromised by any of the two digestion protocols applied (2.4 and 2.7), not even when extending time of digestion to the double for both procedures (i.e. 4 and 2 h, respectively) (data not shown).

2.8. Light microscopy (LM)

Ten freshly isolated cysts were mounted on slides in saline (0.9% NaCl) and ten excysted metacercariae were fixed in hot neutral buffered 4% formalin and mounted on slides in PBS. The parasites were measured and photographed in a Leica DMLB microscope with a Leica DC300 camera (Fig. 1B). The parasites used for the measurements were uncompressed while parasites used for the photos were flattened under coverslip pressure in order to bring as many morphological features into focus as possible. Measurements are presented in micrometers (μ m) as the average followed by the minimum and maximum inside brackets.

2.9. Scanning electron microscopy (SEM)

Ten cysts and ten excysted specimens were taken from each sample and fixed in 2.5% PBS-buffered glutaraldehyde. The samples were washed in PBS, brought through a graded series of alcohol and acetone for dehydration. Critical-point drying was done using an Autosamdri-815(A) (Tousimis, Maryland, USA) on automatic

sequence, after which the specimens were mounted on SEM stubs, sputter-coated and observed in a JEOL JSM-6335-F (FE-SEM, Tokyo, Japan) microscope. All images were digitally processed using standard software.

2.10. Molecular identification

Individual excysted metacercariae preserved in 96% ethanol were air-dried and lysed at 55 °C in 30 μ L of lysis reagent [Tween 20 (0.45%), proteinase K (60 μ L/mL) 10 mM Tris and 1 mM EDTA]. Complete lysis was confirmed by microscopy, whereafter the protease was inactivated at 95 °C for 10 min (Thuy, Kania, & Buchmann, 2010). PCR reactions were performed in a volume of 60 μ L containing 2 μ L lysate as template, 1 unit of BIOTAQ™ DNA polymerase (DNA-Technology), 1 μ M dNTP, 1.5 μ M MgCl₂, and 1 μ M of the primers. In order to amplify the ITS region the primers Diplost_F3 (5'-AGGAATTCTCTGGTAAGTGAAG-3')/Diplost_R4 (5'-TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3') were used (Galazzo, Dayanandan, Marcogliese, & McLaughlin, 2002), and to amplify the mt DNA-Cox1 region the primers COI2575F (5'-TTTTTGGGCATCTGAGGTTTAT-3')/COI3021R (5'-TAAAGAAAGAACAATAATGAAAATG-3') were used (Bowles, Blair, & McManus, 1992). PCR was carried out in a Biometra T3 thermocycler (Fisher Scientific) using the following cycling parameters: ITS primers – pre-denaturation at 94 °C for 5 min, 45 cycles of 94 °C for 30 s, 57 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and post-elongation of 72 °C for 7 min. COI primers – pre-denaturation at 94 °C for 5 min, 35 cycles of 94 °C for 30 s, 50.9 °C for 30 s, 72 °C for 40 s and post-elongation of 72 °C for 7 min. The products were analyzed by ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel electrophoresis. PCR products were purified using the illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) and sequenced at Macrogen Inc. (South Korea) using the PCR primers.

3. Results

3.1. Identification

The metacercariae (encysted and excysted) were identified as *C. lingua* (Creplin) based on morphometric and molecular parameters. Measurements based on ten cysts and ten metacercariae. The cysts were 258.3 (225–282.5) μ m long by 202.3 (190–212.5) μ m wide (Fig. 1B). The body of excysted specimens was covered with scale-like spines; total body length 635.5 (575–675) μ m and largest width 192.5 (175–205) μ m. Oral sucker subterminal, 52.5 (50–55) μ m long and 58.5 (60–55) μ m wide. Prepharynx short; pharynx 38 (30–40) μ m long by 30 (35–25) μ m wide. Ventral sucker small, 24.5 (30–20) μ m long and 24.5 (30–20) μ m wide. The measurements are in accordance with previous descriptions of *C. lingua* metacercariae (Linton, 1915; Stunkard, 1929, 1930). COI region sequences and ITS region sequences were deposited in GenBank under the accession numbers KJ711861–KJ711866 and KJ641518–KJ641524, respectively. These are the first sequences of *C. lingua* for the ITS region deposited in GenBank.

The sequences obtained in this study ($N = 6$) were identical over 387 nt compared. They showed 99% identity to the *C. lingua* COI sequences available in GenBank (EU876333–EU876528).

3.2. Density of parasites in cod tissue

The cod were infected with an average of 45.8 (SD 35.6) metacercariae per cm² of skin and 561.4 (SD 480.2) metacercariae per gram of skin. The outer muscle layer was less infected compared to the skin presenting an average of 2.4 (SD 2.5) metacercariae per gram of muscle (Fig. 2). No metacercariae were found in the inner muscle layers.

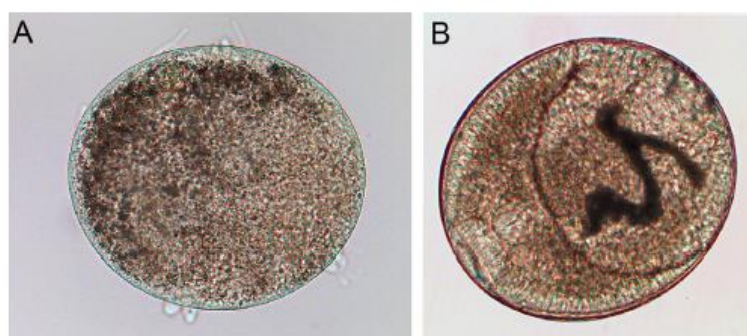


Fig. 1. Encysted *Cryptocotyle lingua* metacercariae. (A) Dead encysted metacercaria (rendered non-viable by incubation at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h) showing loss of morphological features. (B) Live encysted metacercaria presenting oral sucker, pharynx and excretory bladder.

3.3. Survival of metacercariae

Untreated metacercariae (no freezing or heating) showed 100% excystation and viability after incubation for 1 h to the applied trypsin solution. Metacercariae were killed in less than 20 min at $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ whereas it took 2 h at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. For freezing temperatures at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min were necessary to kill all the metacercariae but 2 h were needed at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. The metacercariae were rendered non-viable after 2 h of exposure to all temperatures tested. This applied both for experiments in which isolated metacercariae were placed between fish slices as well as experiments where metacercariae in naturally infected tissue were incubated *in situ*. Controls kept at $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ survived for up to nine days (Table 1a and b). There were no differences (with regard to viability) between the experiments *in situ* and those with isolated metacercariae artificially mounted between fish slices.

3.4. Damage to the cyst wall of encysted metacercariae associated with incubation

The extreme freezing temperature $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ did not cause any visual damage (evaluated by LM and SEM) to the cyst wall even after 30 min of exposure when all metacercariae were already dead (Fig. 3A). The cysts of the metacercariae exposed to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min presented holes, cracks and started to “peel”. The same type of damage was observed in cysts exposed to $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min and 1 h (Fig. 3B–D). These damages might have been exacerbated by the SEM preparation.

3.5. Damage to excysted metacercariae associated with incubation

Metacercariae exposed to $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min and excysted afterward presented an undamaged tegument while metacercariae exposed for 30 min to the same temperature lost most of the morphological characters (Fig. 3E, G and H). The same damage pattern in the tegument was observed in metacercariae exposed

to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h (Fig. 3F). The excystation of metacercariae following exposure to heating temperatures was not as efficient as the excystation of metacercariae exposed to freezing temperatures. SEM micrographs of the broken cysts of metacercariae exposed to $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ showed cracks and loss of scales in the tegument of the metacercariae inside (Fig. 3B and D).

4. Discussion

The present study on both *in situ* and isolated *C. lingua* metacercariae from Atlantic cod has demonstrated that 2 h incubation at temperatures ranging from $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ and from $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ is sufficient to kill these parasites.

Previous studies on the viability of metacercariae after heating or freezing reported a higher resistance of the parasites (Fan, 1998; Hamed & Elias, 1970). It was previously pointed out (FDA, 2001, chap. 5) that effectiveness of frozen storage and heating depends on several factors. These include species of parasite, fat content and fillet thickness.

We have determined the needed incubation conditions for *C. lingua* from Danish waters in a lean fish *G. morhua* and we advocate performance of specific tests for various geographic isolates of zoonotic metacercariae in various host types with different fish meat quality. This will provide a more reliable recommendation and knowledge base of the local legislation for products of different origins.

At high temperatures the presence or absence of water during the incubations seems to be an important factor regarding determination of the incubation time required for inactivation of metacercariae. In pilot experiments carried out for this study the incubation of metacercariae at $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h was not sufficient to kill *C. lingua* metacercariae, but when deionized water was added to the samples before incubation, the cysts were not viable after 20 min. In a study carried out on *Heterophyes* sp. heating without water present showed survival of metacercariae up to 3 h at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$

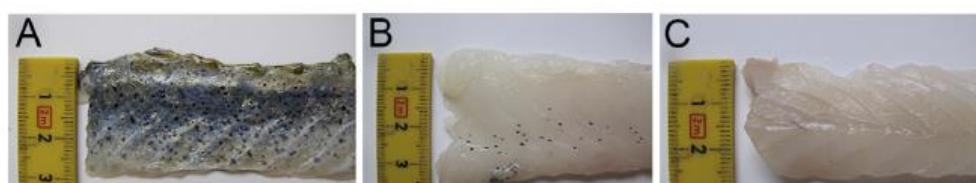


Fig. 2. *Cryptocotyle lingua* metacercariae in cod skin and muscle. (A) Skin viewed from the inside showing numerous black spots (i.e. pigment associated with encysted metacercariae). (B) Outer muscle showing few black spots. (C) Inner muscle free from black spots. Scale bar indicates centimeters (cm).

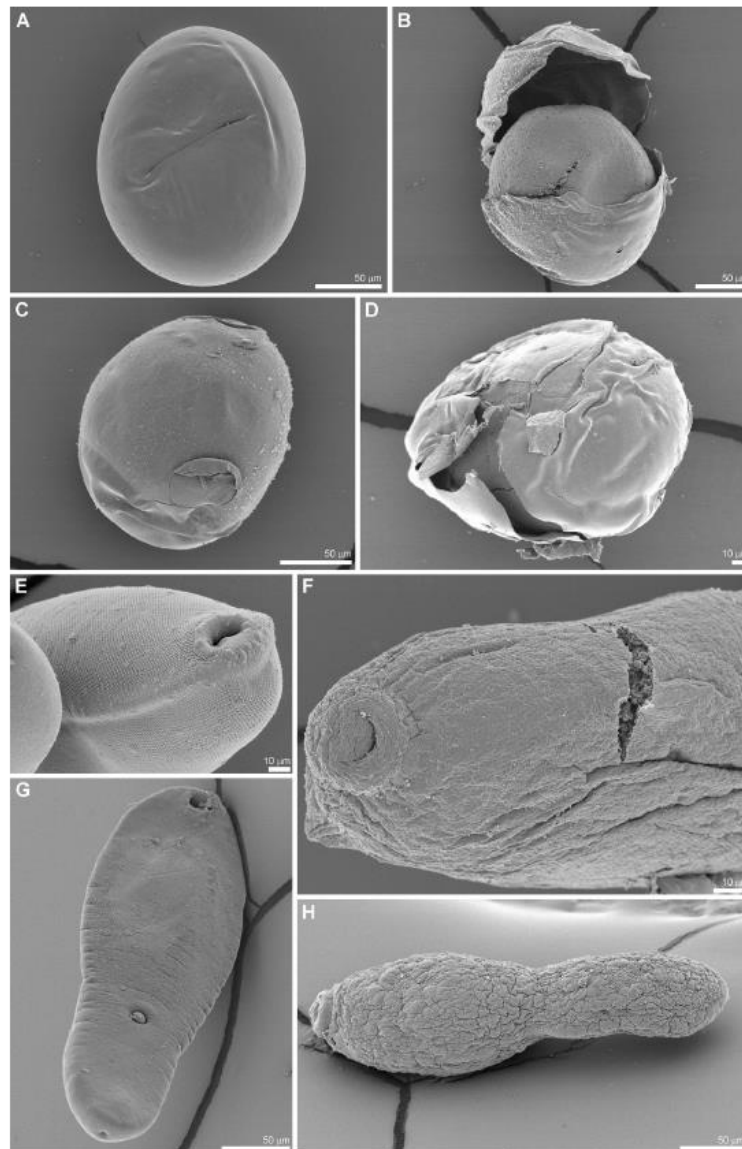


Fig. 3. SEM microscopy of *Cryptocotyle lingua* exposed to freezing and heating. (A) Cyst exposed to $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min. (B) Cyst exposed to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min. (C) Cyst exposed to $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min. (D) Cyst exposed to $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h (E) and (G) Excysted metacercaria exposed to $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min. (F) Excysted metacercaria exposed to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h. (H) Excysted metacercaria exposed to $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min.

and after 10 min at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Hamed & Elias, 1970) suggesting that the presence of water in our study facilitated heat conductance.

Another study from Thailand showed that no viable metacercariae of *Opistorchis viverrini* were found in fish grilled at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 12 min (Prasongwatana, Laummaunwai, Boonmars, & Pinlaor, 2012). In a study from S. Korea the metacercariae of *Clonorchis sinensis* were not viable after 5 min of exposure to $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Cho, Chu,

Rim, & Hwang, 2002). Different results are also found with regard to the time needed to kill metacercariae of different species exposed to freezing temperatures. Studies on *C. sinensis* and *Heterophyes* sp. exposed to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ showed that metacercariae of these species lost viability after seven days and 33 h, respectively (Fan, 1998; Hamed & Elias, 1970). However, it is possible that the metacercariae of a northern species such as *C. lingua* is more

susceptible to high temperatures than those of tropical and sub-tropical trematodes. The current legislation requires freezing of fish or fish products at a temperature not higher than -20°C in all parts of the product for at least 24 h (EFSA, 2004). This procedure is recommended for some fishes when destined for raw or almost raw consumption as well as for some species of fish going through processing such as cold smoking below 60°C (Beldsoe & Oria, 2001; EFSA, 2004, 2010). Although this treatment is sufficient to inactivate *C. lingua* metacercariae, cod is not present in the list of fish species that should go through freezing before smoking processes (EFSA, 2010). Based on this investigation we recommend the industry to freeze cod before cold smoking procedures are performed.

Heat-killed metacercariae ($60\text{--}100^{\circ}\text{C}$) in cysts did not excyst in trypsin even when exposed for more than 1 h. However, freeze-killed metacercariae did excyst, albeit slower than live metacercariae. It may suggest that active movements of the metacercariae are involved in the excystation process. This has been suggested before (Chung, Kong, Joo, Cho, & Kang, 1995; Erasmus & Bennett, 1965) although McDaniel (1966) disputed this. In our study, live metacercariae excysted faster than the dead ones, but the dead metacercariae (killed by freezing) did excyst in less than 1 h of exposure to trypsin solution. Thus, movements of *C. lingua* metacercariae seem to help in the process of excystation but are not essential for its completion.

The role of excretory-secretory products (including proteases) from metacercariae in the excystation process is not totally understood yet, but some studies show the active secretion of products during the excystation in some species of metacercariae (Chung et al., 1995; Johnston & Halton, 1981; Li et al., 2004). We suggest that excystation of freeze-killed but not heat-killed metacercariae may be due to an importance of excretory-secretory products, particularly proteases. These may be inactivated by heating, but may still be active in freeze-killed metacercariae.

In this study cysts exposed to the temperature of -20°C for 30 min showed more cyst wall damages than the ones exposed to -80°C for the same amount of time. Thus the duration of incubation seems to be less important than the temperature in which the cysts were incubated. Metacercariae exposed for the shorter period of time to -20°C (30 min) and 70°C (5 min) presented as much damages as the metacercariae exposed for longer periods (1 h). This could in part be attributed to the SEM preparations. However, the SEM methodology alone would not cause the kind of damage observed if the cysts have not been weakened before. Freezing can cause damage to parasites both by a desiccation caused by the formation of ice crystals in the cysts accompanied by an accumulation of external solutes, and through mechanical damage caused by ice crystals forming in the parasite tissues. At modest subzero temperatures, a lower rate of ice formation leads to the formation of larger ice crystals. The dehydration, on the other hand, may be more efficient at more extreme subzero temperatures when the rate of solute accumulation grows faster (Gill, 2006). The excysted dead parasites were clearly shrunken probably due to the desiccation induced during the freezing process. Formation of intracellular ice crystals may also have been responsible for mechanical damages especially at more extreme freezing temperatures.

The present work should be considered a part of a new catalog to be created on susceptibility to heating and freezing of a range of trematode species from various geographic regions.

Acknowledgments

The PhD student Juliana Novo Borges was funded by the Brazilian program "Science without Borders" from the Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Prof. Jørgen Olesen, Natural History Museum of Denmark, very kindly provided access to the Scanning Electron Microscope used.

References

- Abdussalam, M., Käferstein, F. K., & Mott, K. E. (1995). Food safety measures for the control of food-borne trematode infections. *Food Control*, 6, 71–79.
- Audicana, M. T., & Kennedy, M. W. (2008). *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 360–379.
- Babbott, F. L., Frye, W. W., & Gordon, J. E. (1961). Intestinal parasites of man in Arctic Greenland. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 10, 185–190.
- Barber, I. (2003). Parasites and size-assortative schooling in three-spined sticklebacks. *Oikos*, 101, 331–337.
- Beldsoe, G. E., & Oria, M. P. (2001). Potential hazard in cold-smoked fish: parasites. *Journal of Food Science Supplement*, 66, S1100–S1103.
- Bowles, J., Blair, D., & McManus, D. P. (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Biochemical Parasitology*, 54, 165–174.
- van den Broek, W. L. F. (1979). Infections of estuarine fish populations by *Cryptocotyle lingua* (Creplin). *Journal of Fish Biology*, 14, 395–402.
- Buchmann, K. (1986). Prevalence and intensity of infection of *Cryptocotyle lingua* (Creplin) and *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi) parasitic metacercariae of Baltic cod (*Gadus morhua* L.). *Nordisk Veterinær Medicin*, 38, 303–307.
- Cho, Y. J., Chu, J. P., Rim, H. J., & Hwang, S. K. (2002). Viability of *Clonorchis sinensis* metacercaria according to the food-processing methods. *Infection and Chemotherapy*, 34, 242–247.
- Christensen, N., & Roth, H. (1946). Investigations in gastrointestinal parasites of cats. *Kongelige Veterinær og Landbohøjskole Aarskrift*, 114–144.
- Christensen, N., & Roth, H. (1949). Investigations on internal parasites of dogs. *Kongelige Veterinær og Landbohøjskole Aarskrift*, 1–73.
- Chung, Y. B., Kong, Y., Joo, I. J., Choo, S. Y., & Kang, S. Y. (1995). Excystation of *Paragonimus westermani* metacercariae by endogenous cysteine protease. *Journal of Parasitology*, 81, 137–142.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2010). Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal*, 8, 1543.
- EFSA (European Food Safety Authority) anonymous. (2004). *Regulation (EC) No 853/2004 of the European parliament and council of 29 of April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin*. Available at https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Food_Business/Reg853_2004.pdf Accessed 19.03.14.
- Erasmus, D. A., & Bennett, L. J. (1965). A study of some of the factors affecting excystation in vitro of the metacercarial stages of *Holostephanus lühei* Szidat, 1936 and *Cyathocotyle bushiensis* Khan, 1962 (Strigeida: Trematoda). *Journal of Helminthology*, 39, 185–196.
- Fan, P. C. (1998). Viability of metacercariae of *Clonorchis sinensis* in frozen or salted freshwater fish. *International Journal of Parasitology*, 28, 603–605.
- FAO (U.N. Food and Agriculture Organization). (1998). *Seafood safety – Economics of hazard analysis and critical control point (HACCP) programs*. FAO fisheries technical papers, T381. Available at <http://www.fao.org/DOCREP/003/X0465E/X0465E00.HTM> Accessed 18.03.14.
- Fattakhov, R. G. (1989). Low-temperature regimes for the decontamination of fish of the larvae of *Opisthorchis*. *Meditsinskaja Parazitologija i Parazitarnye Bolezni*, 5, 63–64.
- FDA (U.S. Food and Drug Administration). (2011). *fish and fishery products hazards and controls guidance* (4th ed.). Gainesville: University of Florida.
- Fried, B., Graczyk, T. K., & Tamang, L. (2004). Food-borne intestinal trematodiasis in humans. *Parasitology Research*, 93, 159–170.
- Galazzo, D. E., Dayanandan, S., Marcogliese, D. J., & McLaughlin, J. D. (2002). Molecular systematics of some North American *Diplostomum* (Digenea) based on rDNA-sequence data and comparisons with European congeners. *Canadian Journal of Zoology*, 80, 2207–2217.
- Gill, C. O. (2006). Microbiology of frozen foods. In D. W. Sun (Ed.), *Handbook of frozen food processing and packaging* (pp. 85–100). England: Taylor & Francis.
- Grunert, K. G. (2005). Food quality and safety: consumer perception and demand. *European Review of Agricultural Economics*, 32, 369–391.
- Guilal, J. A. (1968). Investigations on the endoparasitic fauna of the Scandinavian-Baltic population of the black-headed gull (*Larus ridibundus* L.). *Kongelige Veterinær og Landbohøjskole Aarskrift*, 59–78.
- Hamed, M. G. E., & Elias, A. N. (1970). Effect of food-processing methods upon survival of the trematode *Heterophyes* sp. in flesh of mullet caught from brackish Egyptian waters. *Journal of Food Science*, 35, 386–388.
- Healy, G. R. (1970). Trematodes transmitted to man by fish, frogs, and crustacea. *Journal of Wildlife Diseases*, 6, 255–261.
- Hemmingsen, W., Lombardo, I., & MacKenzie, K. (1991). Parasites as biological tags for cod, *Gadus morhua* L., in northern Norway: a pilot study. *Fisheries Research*, 12, 365–373.
- Heuch, P. A., Jansen, P. A., Hansen, H., Sterud, E., Mackenzie, K., Haugen, P., et al. (2011). Parasite faunas of farmed Cod and adjacent wild populations in Norway: a comparison. *Aquaculture Environment Interactions*, 2, 1–13.
- Huss, H. H., Ababouch, L., & Gram, L. (2003). *Assessment and management of seafood quality*. FAO Fisheries technical paper, 444. Rome: FAO.

- Johnston, B. R., & Halton, D. W. (1981). Excystation in vitro of *Bucephaloides graciles* metacercariae (Trematoda: Bucephalidae). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 65, 71–78.
- Køie, M. (1983). Digenetic trematodes from *Limanda limanda* (L.) (Osteichthyes, Pleuronectidae) from Danish and adjacent waters, with special reference to their life-histories. *Ophelia*, 22, 201–228.
- Køie, M. (1984). Digenetic trematodes from *Gadus morhua* L. (Osteichthyes, Gadidae) from Danish and adjacent waters, with special reference to their life-histories. *Ophelia*, 23, 195–222.
- Kristoffersen, R. (1988). A new species of parasite on Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), in seawater cages in Scandinavia. *Aquaculture*, 71, 187–191.
- Kruatrachue, M., Chitramong, Y. P., Upathan, E. S., Vichary, S., & Viyanant, V. (1982). Effects of physico-chemical factors on the infections of hamsters by metacercariae of *Opisthorchis viverrini*. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 13, 614–617.
- Lambert, W. J., Corliss, E., Sha, J., & Smalls, J. (2012). Trematode infections in *Littorina littorea* on the New Hampshire coast. *Northeastern Naturalist*, 19, 461–474.
- Li, S., Chung, Y. B., Chung, B. S., Choi, M. H., Yu, J. R., & Hong, S. T. (2004). The involvement of the cysteine proteases of *Clonorchis sinensis* metacercariae in excystment. *Parasitology Research*, 93, 36–40.
- Linton, E. (1915). *Tocotrema lingua* (Creplin): the adult stage of a skin parasite of the cunner and other fishes of the Woods Hole region. *Journal of Parasitology*, 3, 128–134.
- Lysne, D. A., Hemmingsen, W., & Skorping, A. (1994). The distribution of *Cryptocotyle* spp. metacercariae in the skin of caged Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Fish Biology*, 45, 352–355.
- Mattheus, P. M., Montgomery, W. L., & Hanna, R. E. B. (1985). Infestation of littorinids by larval Digenea around a small fishing port. *Parasitology*, 90, 277–287.
- McDaniel, J. S. (1966). Excystment of *Cryptocotyle lingua* metacercariae. *Biological Bulletin*, 130, 369–377.
- Mellegaard, S., & Lang, T. (1999). Diseases and parasites of Baltic cod (*Gadus morhua*) from the Mecklenburg Bight to the Estonian coast. *ICES Journal of Marine Science*, 56, 154–158.
- Orlandi, P. A., Chu, D. T., Bier, J. W., & Jackson, G. J. (2002). Parasites and the food supply. *Food Technology*, 56, 72–81.
- Portes Santos, C., Lopes, K. C., Costa, V. S., & Santos, E. G. N. (2013). Fish-borne trematodosis: potential risk of infection by *Ascocotyle (Phagicola) longa* (Heterophyidae). *Veterinary Parasitology*, 193, 302–306.
- Prasongwatana, J., Laummaunwai, P., Boonmars, T., & Pinlaor, S. (2012). Viable metacercariae of *Opisthorchis viverrini* in northeastern Thai cyprinid fish dishes—as part of a national program for control of *O. viverrini*-associated cholangiocarcinoma. *Parasitology Research*, 112, 1323–1327.
- Rausch, R. L., Scott, E. M., & Rausch, V. R. (1967). Helminths in eskimos in western Alaska, with particular reference to *Diphyllobothrium* infection and anemia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 61, 351–357.
- Saeed, I., Maddox-Hyttel, C., Monrad, J., & Kapel, C. M. O. (2006). Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Veterinary Parasitology*, 139, 168–179.
- Stunkard, H. W. (1929). The excretory system of *Cryptocotyle* (Heterophyidae). *Journal of Parasitology*, 15, 259–267.
- Stunkard, H. W. (1930). The life history of *Cryptocotyle lingua* (Creplin), with notes on the physiology of the metacercariae. *Journal of Morphology and Physiology*, 50, 143–191.
- Tesana, S., Kaewkes, S., & Phinlaor, S. (1986). Infectivity and survivorship of *Opisthorchis viverrini* metacercariae in fermented fish. *Journal of Parasitology of the Tropical Medical Association Thailand*, 9, 21–30.
- Thuy, D. T., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2010). Infection status of zoonotic trematode metacercariae in Sutchi catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Vietnam: associations with season, management and host age. *Aquaculture*, 302, 19–25.
- Tolonen, A., & Karlsbakk, E. (2003). The parasite fauna of the Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus* L.). *ICES Journal of Marine Science*, 60, 77–84.

ANEXO II

Artigo aceito para publicação no Journal of Fish Diseases

Journal of Fish Diseases - Decision on Manuscript JFD-2016-13.R1

1 mensagem

speare@upei.ca <speare@upei.ca>

15 de abril de 2016 14:05

Para: juliananovo@bol.com.br, cpsantos@ioc.fiocruz.br, vivianes.costa@yahoo.com.br, cymant@hotmail.com, edvaldo.barros.ufv@gmail.com, evertongustavo@globo.com, mafra@ufv.br

15-Apr-2016

Dear Miss Novo Borges,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Molecular characterization and confocal laser scanning microscopic study of *Pygidiopsis macrostomum* (Trematoda: Heterophyidae) parasites of guppies *Poecilia vivipara*" in its current form for publication in Journal of Fish Diseases. I appreciate the manner in which you have considered the comments from the reviewers and added/modified your manuscript accordingly.

Your paper will now be stylistically checked by our Editors to ensure it follows the conventions of the journal, as specified in Units and Spelling in the Author Guidelines (scientific name conventions, etc). To see when your paper has been published in an issue, sign up to receive electronic table of contents – bit.ly/JFDealerts.

Information required from the author:

1 – License Agreement

Your article cannot be published until you have signed the appropriate license agreement. Within the next few days you will receive an email from Wiley's Author Services system which will ask you to log in and will present you with the appropriate license for completion.

2 – Colour Works Agreement

Additionally, if your manuscript contains images that use colour, a completed Colour Work Agreement form must be sent to the Production Editor. The form can be downloaded at:
http://media.wiley.com/assets/7130/56/SN_Sub2000_F_CoW.pdf.

Please post or courier all pages of your completed form to the address below:

Customer Service (OPI)
John Wiley & Sons Ltd,
European Distribution Centre
New Era Estate
Oldlands Way
Bognor Regis
West Sussex
PO22 9NQ

3 – Supporting Information

If your paper contains Supporting Information: Materials submitted as Supporting Information are authorized for publication alongside the online version of the accepted paper. No further Supporting Information can be submitted after acceptance. It is the responsibility of the authors to supply any necessary permissions to the editorial office.

4 - Online Open

OnlineOpen is available to authors of articles who wish to make their article open access. With OnlineOpen the author, their funding agency, or institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in PubMed Central and PMC mirror sites. In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository, or other free public server, immediately on publication. If you want your article to be open access please click on 'Make my article OnlineOpen' and choose the appropriate license by clicking on 'Sign license agreement now' when you log in to Wiley's Author Services system.

ANEXO III

Alinhamento de sequências de *Ascocotyle (Phagicola) longa* (APlon) obtidas neste trabalho, *Phagicola longa* (Plon) e *Ascocotyle nana* (Anan) depositados no GenBank da região 18S rDNA baseado em 308 pares de base.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
APlon E271*  GCGGTTATCTTTGCCCTCTCTGGGGTGATGGGCCGTTTCGCCGGCCGGGTGCGGTGCAGGTGCTACTTCTTAGAGGGACAAGCGGCGTGCCAGTCGCACGAA
APlon E387*  .....
KF697717 Plon  .....AT.....C.....T.....
AY245703 Plon  .....AT.....A.....A.....G
KM659174 Anan  .....AT.....C.....T.....

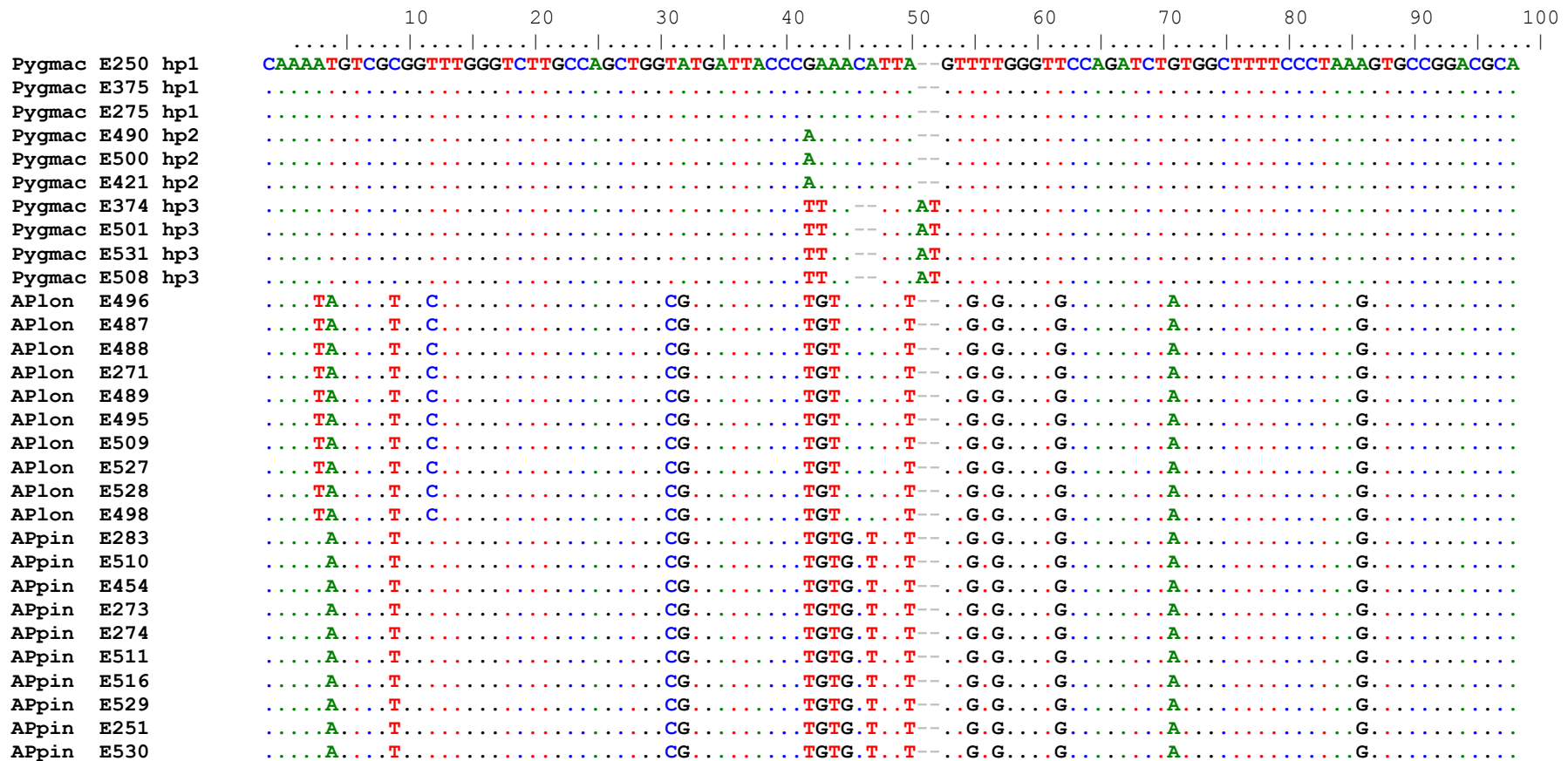
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
APlon E271*  ATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCCGCACGTGCGCTACAATGACGGTTTCAACGAGTTTGGGATCCTAGCTCGAAAGAGC
APlon E387*  .....
KF697717 Plon  .....C.....G..
AY245703 Plon  .....T.....C.....G.T
KM659174 Anan  .....C.....G.T

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
APlon E271*  TGGGTAAACTGAACCATGACCGTCGTGACTGGGATCGGGGCTTGCAATTGTTCCCGTGAACGAGGAATTCCTGGTAAGTGCAGTCATAAGCTTGCGCT
APlon E387*  .....
KF697717 Plon  .....A.....
AY245703 Plon  .....T.....A.....
KM659174 Anan  .....A.....A.....

      .....
APlon E271*  GATTACGT
APlon E387*  .....
KF697717 Plon  .....
AY245703 Plon  .....
KM659174 Anan  .....

```

Alinhamento de sequências de *Pygdiopsis macrostomum* (Pygmac), *Ascocotyle (Phagicola) longa* (APlon) e *Ascocotyle (Phagicola) pindoramensis* (APpin) da região ITS2 rDNA baseado em 283 pares de base (hp = haplótipo).



			110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
												
Pygmac	E250	hp1	ACCATG	TCTAGG	CTGATGG	CCCTGGATG	AGGGAGT	-CGGCGGAGT	CGTGGCTCAGT	-----AATATTA	TGCACGCTTCGTCGATTG	TTCTTCATC	-TA
Pygmac	E375	hp1
Pygmac	E275	hp1
Pygmac	E490	hp2
Pygmac	E500	hp2
Pygmac	E421	hp2
Pygmac	E374	hp3
Pygmac	E501	hp3
Pygmac	E531	hp3
Pygmac	E508	hp3
APlon	E496		T.....	A.....	AGA.....	TT..GA	G.G.....	C..G.TC	AA..TG	..TGCG	
APlon	E487		T.....	A.....	AGA.....	TT..GA	G.G.....	C..G.TC	AA..TG	..TGCG	
APlon	E488		T.....	A.....	AGA.....	TT..GA	G.G.....	C..G.TC	AA..TG	..TGCG	
APlon	E271		T.....	A.....	AGA.....	TT..GA	G.G.....	C..G.TC	AA..TG	..TGCG	
APlon	E489		T.....	A.....	AGA.....	TT..GA	G.G.....	C..G.TC	AA..TG	..TGCG	
APlon	E495		T.....	A.....	AGA.....	TT..GA	G.G.....	C..G.TC	AA..TG	..TGCG	
APlon	E509		T.....	A.....	AGA.....	TT..GA	G.G.....	C..G.TC	AA..TG	..TGCG	
APlon	E527		T.....	A.....	AGA.....	TT..GA	G.G.....	C..G.TC	AA..TG	..TGCG	
APlon	E528		T.....	A.....	AGA.....	TT..GA	G.G.....	C..G.TC	AA..TG	..TGCG	
APlon	E498		T.....	A.....	AGA.....	TT..GA	G.G.....	C..G.TC	AA..TG	..TGCG	
APpin	E283		T.....	G.....	A.....	AG..GG	TGATTG	A..A..G	..C..T.TC	AA..C.TG	..AT.G	
APpin	E510		T.....	G.....	A.....	AG..GG	TGATTG	A..A..G	..C..T.TC	AA..C.TG	..AT.G	
APpin	E454		T.....	G.....	A.....	AG..GG	TGATTG	A..A..G	..C..T.TC	AA..C.TG	..AT.G	
APpin	E273		T.....	G.....	A.....	AG..GG	TGATTG	A..A..G	..C..T.TC	AA..C.TG	..AT.G	
APpin	E274		T.....	G.....	A.....	AG..GG	TGATTG	A..A..G	..C..T.TC	AA..C.TG	..AT.G	
APpin	E511		T.....	G.....	A.....	AG..GG	TGATTG	A..A..G	..C..T.TC	AA..C.TG	..AT.G	
APpin	E516		T.....	G.....	A.....	AG..GG	TGATTG	A..A..G	..C..T.TC	AA..C.TG	..AT.G	
APpin	E529		T.....	G.....	A.....	AG..GG	TGATTG	A..A..G	..C..T.TC	AA..C.TG	..AT.G	
APpin	E251		T.....	G.....	A.....	AG..GG	TGATTG	A..A..G	..C..T.TC	AA..C.TG	..AT.G	
APpin	E530		T.....	G.....	A.....	AG..GG	TGATTG	A..A..G	..C..T.TC	AA..C.TG	..AT.G	
		
			210	220	230	240	250	260	270	280			
												
Pygmac	E250	hp1	GCTACGGT	CCCTTGA	CT-TGGCA	CTGCATCC	TTTACAAT	---GAGACG	CAATTCAGGT	---GTC	TCACTAAC	TGACCTCGG	TTCA
Pygmac	E375	hp1
Pygmac	E275	hp1
Pygmac	E490	hp2

ANEXO IV

Tabela de sequências das espécies do GenBank utilizadas nos alinhamentos e análises filogenéticas.

Espécie	N° de acesso	Hospedeiro	Local
18S rDNA			
<i>Pholeter gastrophilus</i>	KM258668	<i>Tursiops truncatus</i>	Espanha
<i>Metagonimus yokogawai</i>	HQ832630	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Centrocestus formosanus</i>	HQ832630	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Metagonimus takahashii</i>	HQ832627	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Dexiogonimus ciureanus</i>	AY245702	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Israel
<i>Metagonimus miyatai</i>	HQ832624	<i>Plecoglossus altivelis</i>	Japão
<i>Euryhelmis costaricensis</i>	AB521800	<i>Hynobius lichenatus</i>	Japão
<i>Phagicola longa</i>	AY245703	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Israel
<i>Cryptocotyle lingua</i>	AJ287492	<i>Littorina littorea</i>	Alemanha
<i>Haplorchis taichui</i>	HM004213	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Phagicolinae sp.</i>	AY245766	-	Israel
<i>Haplorchis yokogawai</i>	HM004198	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Procerovum varium</i>	HM004199	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Pygidiopsis genata</i>	AY245710	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Israel
<i>Stellantchasmus falcatus</i>	HM004202	Humano	Vietnã
<i>Galactosomum lacteum</i>	AY222120	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Ucrânia
<i>Haplorchis pumilio</i>	HM004195	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Procerovum cheni</i>	HM004212	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Echinostoma revolutum</i>	AY222132	<i>Mesocricetus auratus</i>	Reino Unido
<i>Phagicola longa</i>	KF697717	<i>Mugil lisa</i>	Argentina
<i>Ascocotyle nana</i>	KM659174	<i>Micropterus salmoides</i>	EUA
28S rDNA			
<i>Pholeter gastrophilus</i>	KM258674	<i>Tursiops truncatus</i>	Espanha
<i>Cryptocotyle lingua</i>	AY222228	<i>Littorina littorea</i>	Alemanha
<i>Metagonimoides oregonensis</i>	JQ995473	<i>Pleurocera proxima</i>	EUA
<i>Metagonimus yokogawai</i>	HQ832639	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Metagonimus takahashii</i>	HQ832636	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Metagonimus katuradai</i>	KM061393	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Metagonimus miyatai</i>	HQ832633	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Metagonimus otsurui</i>	KM061396	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Metagonimus hakubaensis</i>	KM061390	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Centrocestus formosanus</i>	HQ874609	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Euryhelmis costaricensis</i>	AB521800	<i>Martes melampus</i>	Japão
<i>Procerovum varium</i>	HM004182	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Procerovum cheni</i>	HM004179	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Haplorchis pumilio</i>	HM004173	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Haplorchis yokogawai</i>	HM004192	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Haplorchis taichui</i>	HM004181	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Galactosomum lacteum</i>	AY222227	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Ucrânia
<i>Stellantchasmus falcatus</i>	HM004174	Humano	Vietnã
<i>Haplorchoides sp.</i>	AY222226	<i>Arius graeffei</i>	Austrália
<i>Echinostoma revolutum</i>	KP065599	<i>Stagnicola palustris</i>	Rep. Checa
ITS2 rDNA			
<i>Pygidiopsis genata</i>	AY245710	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Israel
<i>Pholeter gastrophilus</i>	KT883855	<i>Tursiops truncatus</i>	Espanha
<i>Cryptocotyle lingua</i>	KJ641524	<i>Gadus morhua</i>	Dinamarca
<i>Phagicola longa</i>	AY245703	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Israel
<i>Dexiogonimus ciureanus</i>	AY245702	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Israel
<i>Euryhelmis zelleri</i>	KM594177	<i>Bythinella austriaca</i>	Eslováquia

<i>Acanthotrema tridactyla</i>	KF447593	<i>Cerithidea cingulata</i>	Kwait
<i>Pseudamphistomum truncatum</i>	JF710315	<i>Lutra lutra</i>	Inglaterra
<i>Metagonimus katsuradai</i>	KM061402	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Haplorchis taichui</i>	EU826640	<i>Labeo rohita</i>	Vietnã
<i>Haplorchis pumilio</i>	AY245706	-	Israel
<i>Metagonimus miyatai</i>	HQ832617	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Metagonimus otsurui</i>	KM061405	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Metagonimus hakubaensis</i>	KM061399	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Metagonimus takahashii</i>	HQ832618	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Haplorchis popelkae</i>	EU883586	<i>Elseya dentata</i>	Austrália
<i>Metagonimus yokogawai</i>	HQ832621	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Procerovum cheni</i>	HM004165	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Procerovum varium</i>	HM004169	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Stellantchasmus falcatus</i>	HM004172	Humano	Vietnã
<i>Metorchis orientalis</i>	HM347227	<i>Pseudorasbora parva</i>	Vietnã
<i>Metorchis albidus</i>	JF710316	<i>Lutra lutra</i>	Inglaterra
<i>Clonorchis sinensis</i>	KJ137224	<i>Felis catus</i>	China
<i>Euamphimerus pancreaticus</i>	KT740984	<i>Turdus philomelos</i>	República Checa
<i>Opisthorchis felineus</i>	EF688136	-	Rússia
<i>Opisthorchis lobatus</i>	HQ328547	<i>Mesocricetus auratus</i>	Laos
<i>Opisthorchis noverca</i>	KJ767634	<i>Mesocricetus auratus</i>	Laos
<i>Opisthorchis viverrini</i>	HQ328550	<i>Mesocricetus auratus</i>	Laos
<i>Prosorhynchus longisaccatus</i>	KT213581	<i>Epinephelus undulatostratus</i>	Austrália
mtDNA <i>cox-1</i>			
<i>Haplorchis pumilio</i>	KF044303		
<i>Acanthotrema tridactyla</i>	KF447594	<i>Cerithidea cingulata</i>	Kwait
<i>Centrocestus caninus</i>	KF044300	-	
<i>Metagonimus hakubaensis</i>	Japão	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Metagonimus katsuradai</i>	KM061420	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Metagonimus miyatai</i>	KM061411	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Cryptocotyle lingua</i>	KJ711866	<i>Gadus morhua</i>	Dinamarca
<i>Cryptocotyle lingua</i>	EU876527	<i>Littorina littorea</i>	EUA
<i>Metagonimus takahashii</i>	KM061408	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Metagonimus otsurui</i>	KM061423	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Metagonimus yokogawai</i>	KM061414	<i>Mesocricetus auratus</i>	Japão
<i>Haplorchis taichui</i>	JX174405	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia
<i>Haplorchis taichui</i>	JN809891	Humano	Vietnã
<i>Pygidiopsis summa</i>	AF181884	-	Coréia
<i>Galactosomum sp.</i>	FJ765489	<i>Zeacumantus subcarinatus</i>	Nova Zelândia
<i>Metorchis albidus</i>	KP869077	<i>Lutra lutra ou Neovison vison</i>	França
<i>Mentorchis xanthosomus</i>	KT740974	<i>Aythya fuligula</i>	República Checa
<i>Opisthorchis felineus</i>	EF688128	-	Rússia
<i>Opisthorchis lobatus</i>	HQ328541	<i>Mesocricetus auratus</i>	Laos
<i>Pseudamphistomum truncatum</i>	KP869085	<i>Lutra lutra ou Neovison vison</i>	França
<i>Opisthorchis viverrini</i>	KT726410	-	Vietnã
<i>Clonorchis sinensis</i>	JX040571	Rato	Rússia
<i>Fasciola hepatica</i>	AB510491	<i>Bos taurus</i>	Egito