

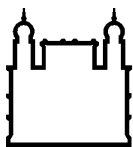
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE
DIDYMOZOIDAE (TREMATODA, DIGENEA) PARASITOS DE *Thunnus*
obesus (SCOMBRIDAE) OCORRENTES AO LARGO DA COSTA DO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO

ANA MARIA MOREIRA DA SILVA

Rio de Janeiro
Setembro de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

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

ANA MARIA MOREIRA DA SILVA

Identificação morfológica e molecular de Didymozoidae (Trematoda, Digenea) parasitos de *Thunnus obesus* (Scombridae) ocorrentes ao largo da costa do Estado do Rio de Janeiro

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

Orientadora: Prof. Dra. Simone Chinicz Cohen

RIO DE JANEIRO
Setembro de 2018

Moreira-Silva, Ana Maria.

Identificação morfológica e molecular de Didymozoidae (Trematoda, Digenea) parasitos de *Thunnus obesus* (Scombridae) ocorrentes ao largo da costa do estado do Rio de Janeiro / Ana Maria Moreira-Silva. - Rio de Janeiro, 2018.

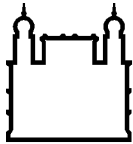
101 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2018.

Orientadora: Simone Chinciz Cohen.

Bibliografia: f. 65-75

1. Didymozoidae. 2. *Thunnus obesus*. 3. Rio de Janeiro. 4. Trematoda. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

AUTORA: ANA MARIA MOREIRA DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE DIDYMOZOIDAE
(TREMATODA, DIGENEA) PARASITOS DE *Thunnus obesus* (SCOMBRIDAE)
OCORRENTES AO LARGO DA COSTA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Simone Chincz Cohen

Aprovada em: 27/09/2018

EXAMINADORES:

Profa. Dra. – Presidente - Rosângela Rodrigues e Silva (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ)

Prof. Dr. Ricardo Massato Takemoto (Universidade Estadual de Maringá)

Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva (Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - UFRRJ)

Profa. Dra. Alena Mayo Iñiguez (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ)

Prof. Dr. Luís Cláudio Muniz Pereira (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 27 de setembro de 2018

*À tia Sílvia, que me ensinou a observar
o lado positivo de qualquer situação.
Amo você.*

À Ana Lúcia, Sueli, Simone, Márcia e principalmente, Sandro, por todo apoio, força, carinho e paciência nos momentos de dificuldades.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Oswaldo Cruz, em especial a todos os membros do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde pela oportunidade de realização deste mestrado e todos os ensinamentos essenciais na minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

À minha orientadora e amiga Dra. Simone Chinicz Cohen do Laboratório de Helmintos Parasitos de Peixes, Instituto Oswaldo Cruz por todo carinho e todos os ensinamentos que me ajudaram a ser não apenas uma bióloga melhor, mas uma pessoa mais madura e firme.

À minha grande amiga Dra. Márcia Cristina Nascimento Justo do Laboratório de Helmintos Parasitos de Peixes, Instituto Oswaldo Cruz por toda ajuda, conselhos, carinho e amizade.

À toda equipe do Laboratório de Helmintos Parasitos de Peixes, Instituto Oswaldo Cruz, Dra. Melissa Querido Cárdenas Rossas com seu jeito doce e sempre prestativo, Dra. Berenice Maria Fernandes de Lima que me proporcionou grandes ensinamentos, Dra. Ana Cláudia Fiuza pela ajuda, ao técnico José Paulo Roberto de Almeida, “o Paulinho” sempre tão amável e solícito, aos alunos de iniciação científica, Dênis Oliveira, Daniele Gen, Taís Santos e Álvaro Freitas, grandes amigas que vou levar no meu coração para o resto da minha vida, e aos alunos do Programa de Vocação Científica Yuri Meneses e Larissa Nascimento os quais tenho enorme carinho, a todos vocês, que transformaram os meus dias de trabalhos mais produtivos e felizes, sem dúvida todos vocês são como uma segunda família!

À Dra. Alena Mayo Iñiguez do Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz pelo apoio e acolhimento em seu laboratório, além de todos os ensinamentos que foram essenciais para que os trabalhos de biologia molecular desta dissertação fossem realizados.

À doutoranda Lucélia Guedes Ribeiro da Silva do Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos por todo o apoio e valiosa ajuda nessa caminhada.

Ao Dr. Fabiano Matos e ao Dr. Luís Muniz, do Laboratório de Helminhos Parasitos de Vertebrados pelo apoio e presteza quando precisei.

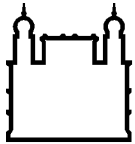
Ao Thiago Zennaro pelo grande apoio na obtenção dos peixes e também grande amizade.

À técnica de esterilização Cleonice Silva pela ajuda e presteza durante a realização das necrópsias.

Às amigas, também alunas do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, Pilar Corrêa, Raquel Gonzalez e Gabriele Reis que tive a honra de conhecer e ter o apoio.

“O poder que reside nele é novo na natureza, e nenhum outro senão ele sabe o que é que pode fazer, e não o saberá até que o tente.”

Ralph Waldo Emerson



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE DIDYMOZOIDAE (TREMATODA, DIGENEA) PARASITOS DE *Thunnus obesus* (SCOMBRIDAE) OCORRENTES AO LARGO DA COSTA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RESUMO

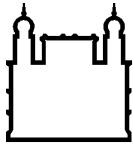
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Ana Maria Moreira da Silva

Os Tuníneos são peixes ósseos marinhos, tipicamente pelágicos, pertencentes à família Scombridae e representam um dos principais recursos pesqueiros do Brasil. *Thunnus obesus*, (Lowe), conhecido comumente no Brasil como albacora bandolim, é uma espécie com ampla distribuição geográfica em águas tropicais e subtropicais. São altamente migratórios, o que favorece a infecção por diferentes grupos de helmintos, principalmente espécies da família Didymozoidae Monticelli, 1888. Os trematódeos pertencentes à esta família representam um grupo de parasitos que usualmente vivem encistados aos pares nos tecidos de teleósteos marinhos, principalmente Scombridae. O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar morfometricamente e molecularmente trematódeos da família Didymozoidae parasitos de *T. obesus* coletados ao largo da costa do estado do Rio de Janeiro. Foram obtidos 12 exemplares de *T. obesus* diretamente de comerciantes no Mercado Municipal de São Pedro em Niterói, Rio de Janeiro. Os peixes apresentaram peso variando de 3,015 a 5,215 Kg e comprimento padrão variando de 53 a 64 cm sendo 3 fêmeas e 9 machos. Para estudos morfológicos pela microscopia de luz, os parasitos foram fixados em AFA com ou sem compressão entre lâmina e lamínula, corados em carmim alcoólico de Langeron, desidratados em série alcoólica, clarificados em óleo de cravo e montados em lâminas em bálsamo do Canadá. Para as análises genéticas, o DNA foi extraído utilizando a digestão física em nitrogênio líquido, química com Proteinase K, seguido do Kit DNeasy Plant Mini. Para PCR foi usado o alvo ITS2 e posterior sequenciamento nucleotídico. Oito diferentes espécies foram identificadas de acordo com a morfologia: *Platocystis vivipara* (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1987, *Didymocystis lamotheargumedei* Kohn e Justo, 2008, *Didymocystis neothunni* (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1996, *Didymosulcus philobranchiarca* (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1990, *Koellikerioides internogastricus* Yamaguti, 1970, *Koellikerioides intestinalis* Yamaguti, 1970, Didymozoidae gen. sp. 1 e Didymozoidae gen sp. 2. Foram obtidas sequências nucleotídicas de cinco espécies: *Koellikerioides internogastricus* (n=4), *Didymosulcus philobranchiarca* (n=2), *Didymocystis neothunni* (n=1), *Platocystis vivipara* (n=2) e Didymozoidae gen. sp. 1 (n=1). Apesar da pouca informação genética disponível da família, o resultado da análise permitiu que fossem realizados alinhamentos onde foram observados polimorfismos e matrizes de distância genética intra e interespecíficas, além de uma matriz de

distância intergênica. Este é o primeiro estudo de taxonomia integrativa de didimozoídeos parasitos de *T. obesus* coletados na costa brasileira, sendo o primeiro com abordagens moleculares de didimozoídeos marinhos do Brasil. *Platocystis vivipara* é registrada pela primeira vez na América do Sul, ampliando sua distribuição geográfica, *T. obesus* é registrado como novo hospedeiro para *D. lamotheargumedei*, *D. neothunni* é pela primeira vez registrado em *T. obesus* no Brasil, região do Atlântico Sul Ocidental, além de informação genética inédita para cinco espécies do estudo. Esse estudo expande o conhecimento morfológico, molecular e a distribuição geográfica da família Didymozoidae na América do Sul.

Palavras-chave: Didymozoidae, *Thunnus obesus*, Rio de Janeiro, Trematoda.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF DIDYMOZOIDAE (TREMATODA, DIGENEA) PARASITES OF *Thunnus obesus* (SCOMBRIDAE) OCCURRING OVER THE COAST OF THE STATE OF RIO DE JANEIRO

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSITY AND HEALTH

Ana Maria Moreira da Silva

The Thunnini are bony marine fishes, typically pelagic, belonging to the family Scombridae and represent one of the most important fishing resources of Brazil. *Thunnus obesus* (Lowe), commonly known as “albacora bandolim” is a species with worldwide geographical distribution in tropical and subtropical waters. They are highly migratory fishes, which favors the infection by different group of helminths, specially species from the family Didymozoidae Monticelli, 1888. Trematodes belonging to Didymozoidae represent a group of parasites that generally lives encysted in pairs in marine teleosteans tissues, mainly Scombridae. The aim of this study was to identify and characterize morphometrically and molecularly species of the family Didymozoidae parasites of *T. obesus* collected from the coast of Rio de Janeiro State. Twelve specimens of *T. obesus* were obtained from sellers in municipal Market of Niteroi, Rio de Janeiro, with weight varying from 3,015 to 5,215 Kg and length from 53 to 64 cm, being 3 females and 9 males. For morphological studies by light microscopy, parasites were fixed in AFA with or without compression, stained in alcoholic-acid carmine, dehydrated in alcohol series, cleared in clove oil and mounted in Canada balsam. For genetic analysis, DNA was extracted using the physical digestion with liquid nitrogen, chemical by proteinase K, followed by Kit DNeasy Plant Mini. For the PCR it was used ITS2 as target and posteriorly nucleotide sequencing. Eight different species were identified according to morphological characterization: *Platocystis vivipara* (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1987, *Didymocystis lamotheargumedoi* Kohn e Justo, 2008, *Didymocystis neothunni* (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1996, *Didymosulcus philobranthiarca* (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1990, *Koellikerioides internogastricus* Yamaguti, 1970, *Koellikerioides intestinalis* Yamaguti, 1970, Didymozoidae gen. sp. 1 and Didymozoidae gen sp. 2. Nucleotide sequencing were obtained for five species: *Koellikerioides internogastricus* (n=4), *Didymosulcus philobranthiarca* (n=2), *Didymocystis neothunni* (n=1), *Platocystis vivipara* (n=2) and Didymozoidae gen. sp. 1 (n=1). Despite little genetic information available for the family, the results of the analysis promoted alignments where polymorphisms and genetic distance matrices inter and intraespecific were observed, as well as intergenetic distance matrix. This is the first study on integrative taxonomy of didymozoids parasites from *T. obesus* collected from Brazilian coast, with molecular approaches from marine didymozoids from Brazil. *Platocystis vivipara* is reported for the first time in South America, expanding its geographical distribution, *T. obesus* is recorded as new host for *D.*

lamotheargumedei, *D. neothunni* is reported for the first time in *T. obesus* in Brasil, South Atlantic region, besides the unpublished genetic information for the five studied species. The presente study broad the morphological, molecular and biogeographical knowledge of Didymozoidae from South America.

Key words: Didymozoidae, *Thunnus obesus*, Rio de Janeiro, Trematoda.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XVI
LISTA DE TABELAS	XVII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O hospedeiro <i>Thunnus obesus</i> (Lowe, 1839)	2
1.2 Família Didymozoidae	3
2 JUSTIFICATIVA	7
3 OBJETIVOS	8
3.1 Objetivo Geral	8
3.2 Objetivos Específicos	8
4 MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1 Hospedeiros	9
4.1.1 Coleta dos hospedeiros	9
4.1.2 Identificação e análise dos hospedeiros	9
4.2 Parasitos	9
4.2.1 Coleta e processamento	9
4.2.2 Análise morfológica	10
4.2.2.1 Morfometria e imagens	10
4.2.2.2 Classificação taxonômica e determinação dos parasitos	10
4.2.3 Análise molecular	11
4.2.3.1 Amostras	11
4.2.3.2 Extração do DNA	12
4.2.3.3 Reação em cadeia de polimerase e sequenciamento nucleotídico	12
4.2.3.4 Análise das sequências	13

5	RESULTADOS	14
5.1	Biometria e pesagem dos hospedeiros	14
5.2	Análises morfológicas	14
5.2.1	<i>Didymocystis lamotheargumedi</i> Kohn e Justo, 2008	15
5.2.2	<i>Didymocystis neothunni</i> (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1996.....	21
5.2.3	<i>Didymosulcus philobranchiarca</i> (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1990	24
5.2.4	<i>Platocystis vivipara</i> (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1987.....	27
5.2.5	<i>Koelikerioides intestinalis</i> Yamaguti, 1970.....	30
5.2.6	<i>Koelikerioides internogastricus</i> Yamaguti, 1970	33
5.2.7	Didymozoidae gen. sp. 1	36
5.2.8	Didymozoidae gen. sp 2	37
5.2	Análises moleculares	38
5.2.1	Dosagem	38
5.2.2	Amplificação do DNA.....	38
5.2.3	Análise Genética.....	40
5.2.3.1	<i>Didymocystis neothunni</i>	40
5.2.3.2	<i>Didymosulcus philobranchiarca</i>	43
5.2.3.3	<i>Koelikerioides internogastricus</i>	45
5.2.3.4	<i>Platocystis vivipara</i>	47
5.2.3.5	Didymozoidae gen sp. 1	50
6	DISCUSSÃO	56
6.1	Sistemática e distribuição geográfica	56
6.2	Potencial zoonótico	58
6.3	Análises moleculares	59
7	CONCLUSÕES	63
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
9	ANEXOS	76
	Anexo 1. Alinhamento completo <i>Didymosulcus philobranchiarca</i>....	77

Anexo 2. Alinhamento completo Didymozoidae gen. sp. 1	79
--	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição de albacora bandolim, <i>Thunnus obesus</i> , globalmente.	2
Figura 2: <i>Thunnus obesus</i> (Lowe, 1839)	14
Figura 3: <i>Didymocystis lamotheargumedei</i> Kohn & Justo, 2008.....	19
Figura 4: Fotomicrografias de <i>Didymocystis lamotheargumedei</i> Kohn & Justo, 2008	20
Figura 5: Fotomicrografias de <i>Didymocystis neothunni</i> (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1996 parasito de <i>Thunnus obesus</i>	23
Figura 6: <i>Didymosulcus philobranchiarca</i> (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1990	26
Figura 7: <i>Platocystis vivipara</i> (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1987	29
Figura 8: Fotomicrografia de <i>Koellikeroides intestinalis</i> Yamaguti, 1970 parasito de <i>Thunnus obesus</i>	32
Figura 9: Fotomicrografias de <i>Koellikeroides internogastricus</i> Yamaguti, 1970 parasito de <i>Thunnus obesus</i>	35
Figura 10: Resultado da eletroforese dos produtos da PCR	39
Figura 11: Resultado da eletroforese dos produtos da PCR	39
Figura 12: Alinhamento de sequências de ITS2 de <i>Didymocystis neothunni</i>	42
Figura 13: Alinhamento de sequências de ITS2 de <i>Didymosulcus philobranchiarca</i>	42
Figura 14: Alinhamento de sequências de ITS2 de <i>Koellikeroides internogastricus</i>	44
Figura 15: Alinhamento de sequências de ITS2 de <i>Platocystis vivipara</i>	47
Figura 16: Alinhamento de sequências de ITS2 de Didymozoidae gen. sp. 1	49

Lista de Tabelas

Tabela 1. Didimozoídeos coletados em <i>Thunnus obesus</i> e seus respectivos números de identificação (ID).....	11
Tabela 2. Definições do alvo genético e primers utilizados neste estudo.....	12
Tabela 3. Concentrações de DNA (ng/μL) das amostras de didimozoídeos parasitos de <i>Thunnus obesus</i> obtidas após procedimento de extração.....	38
Tabela 4. Número de sequências obtidas referente a cada espécie de didimozoídeo parasito de <i>Thunnus obesus</i> após o sequenciamento nucleotídico das amostras.....	40
Tabela 5. Matriz de distância genética intraespecífica de <i>Didymocystis neothunni</i>	41
Tabela 6. Matriz de distância genética interespecífica de <i>Didymocystis neothunni</i>	41
Tabela 7. Matriz de distância genética intraespecífica de <i>Didymosulcus philobranchiarca</i>	43
Tabela 8. Matriz de distância genética interespecífica de <i>Didymosulcus philobranchiarca</i>	45
Tabela 9. Matriz de distância genética intraespecífica de <i>Koellikerioides internogastricus</i>	47
Tabela 10. Matriz de distância genética interespecífica de <i>Koellikerioides internogastricus</i>	47
Tabela 11. Matriz de distância genética intraespecífica de <i>Platocystis vivipara</i>	48
Tabela 12. Matriz de distância genética interespecífica de <i>Platocystis vivipara</i>	48
Tabela 13. Matriz de distância genética intraespecífica de Didymozoidae gen. sp. 1.....	53
Tabela 14. Matriz de distância genética interespecífica de Didymozoidae gen. sp. 1.....	54

Tabela 15. Matriz de distância genética intergênero de Didymozoidae	
gen. sp. 1	55

1 INTRODUÇÃO

Os tuníneos são peixes ósseos marinhos, tipicamente pelágicos, sendo algumas espécies costeiras e outras de alto mar e estão distribuídos por mares tropicais e subtropicais, sendo considerados de grande importância econômica e esportiva (Collete & Nauen, 1983). Têm por característica a formação de cardumes, fato este que favorece muito a indústria pesqueira, já que desta forma podem ser capturados em maior quantidade e em menor tempo (Contreras-Guzmán, 1994), apresentando também uma alta densidade de desova e rápido crescimento (Chatwin, 1997). Apresentam um sistema de termorregulação que lhes confere a capacidade de elevar a temperatura do corpo acima da temperatura da água onde nadam (Altringham & Block, 1997). Essa termorregulação está associada à altos padrões metabólicos e à um sistema circulatório especializado que reduz a perda de calor, mantendo a temperatura da musculatura superior à da água (Brill, 1987, 1996). Essa estratégia para alcançar um balanço energético favorável inclui migrações para áreas de alimentação produtivas, muitas vezes cruzando bacias oceânicas inteiras (Fouteneau, 1997).

Devido a esse comportamento migratório, não limitado a um determinado oceano ou região e pelo grande potencial de exploração dos atuns no Oceano Atlântico, em 1969 foi criada a *International Commission for Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT)*, com a responsabilidade específica para a conservação, gerenciamento e pesquisa das espécies de escombrídeos do Oceano Atlântico, hoje constituída por mais de 30 países, inclusive o Brasil. O ICCAT, baseado em evidências científicas, recomenda medidas de regulamentação para atividade pesqueira no Atlântico, com o objetivo de manter estas espécies em níveis sustentáveis (ICCAT, 2007).

Os escombrídeos representam um dos principais recursos pesqueiros da Zona Econômica Exclusiva (ZEE) do Brasil, ficando entre os peixes mais capturados no Atlântico Sul ocidental. Isso se dá principalmente, pelo fato de o Brasil encontrar-se estrategicamente localizado em relação às áreas de ocorrência das principais espécies de atuns capturadas no Oceano Atlântico (Zagaglia, 2003).

1.1 O hospedeiro *Thunnus obesus* (Lowe, 1839)

Thunnus obesus, conhecido comumente como albacora bandolim, patudo e “bigeye tuna”, é uma espécie pertencente à família Scombridae Rafinesque, 1815, que possui ampla distribuição geográfica nas águas tropicais e subtropicais dos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico, mas ausentes no Mediterrâneo (Figura 1). A temperatura e a profundidade do termoclima parecem ser os principais fatores que regem a distribuição vertical e horizontal desta espécie epipelágica e mesopelágica oceânica, que ocorre da superfície a cerca de 250 metros de profundidade e em águas com temperaturas que variam de 13° a 29° C, sendo a faixa ideal entre 17° a 22° C (Collete & Nauen, 1983).

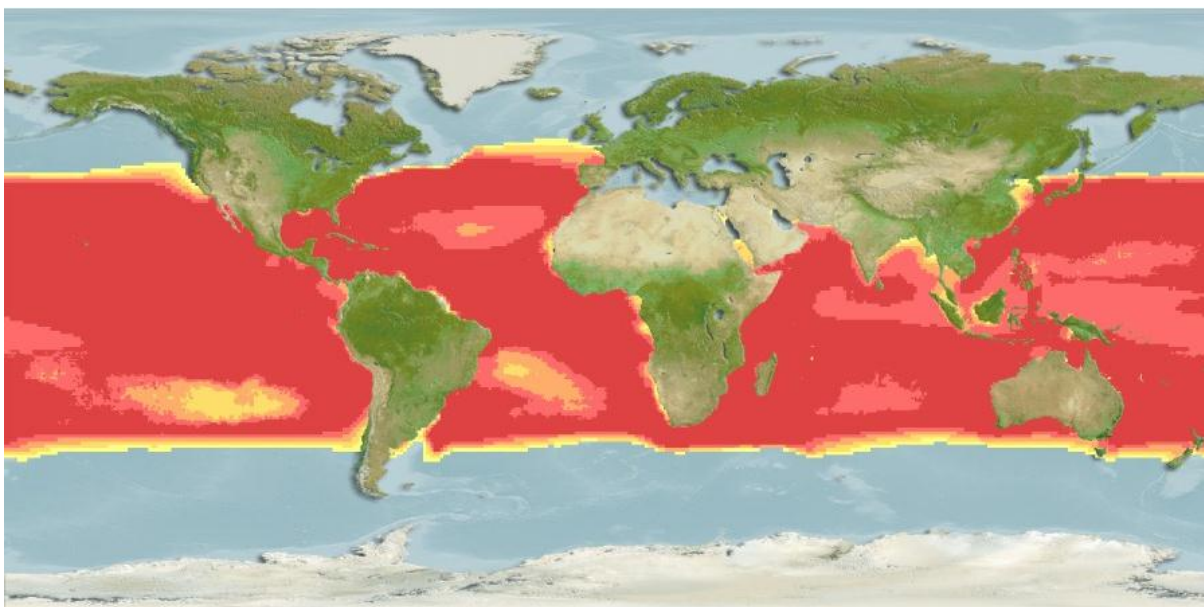


Figura 1: Distribuição de albacora bandolim, *Thunnus obesus*, globalmente. Cor vermelha e amarela representa locais de maior e menor abundância, respectivamente.

Fonte: https://www.aquamaps.org/receive.php?type_of_map=regular

Segundo dados do Guia de Identificação dos Atuns do Atlântico (2008), ao contrário dos demais tunídeos, a albacora bandolim possui o corpo mais robusto, olhos grandes e arredondados, segunda barbatana dorsal levemente mais alta que a primeira e barbatanas peitorais moderadamente longas, possuindo cerca de 22 a 31% do comprimento total nos indivíduos adultos. De acordo com Fischer (1978), esta espécie possui o pedúnculo caudal ligeiramente delgado, com uma quilha

lateral forte entre duas quilhas menores, além disso a superfície ventral do fígado é estriada, sendo este caráter de grande importância para distinguir a albacora bandolim das espécies similares de tunídeos que são encontradas na mesma área de ocorrência. Collette & Nauen (1983) relatam que juvenis e adultos pequenos costumam formar cardumes com outros tunídeos e afins, como a albacora e o bonito.

No Oceano Atlântico, a maior área de crescimento conhecida para essa espécie situa-se no Golfo da Guiné, onde jovens formam grandes cardumes próximo à superfície, sendo, nessa fase, alvo das capturas por artes de pesca de superfície (Miyake, 1990). No litoral Sudeste-Sul do Brasil, a albacora bandolim é pescada principalmente por embarcações atuneiras (Fagundes et al. 2001).

Thunnus obesus é uma espécie de grande importância e de alto valor comercial para a indústria pesqueira mundial. De acordo com o *International Union for Conservation of Nature (IUCN)*, seu estado de conservação é considerado vulnerável. Em 1997 foi criado o projeto *BETYP (Bigeye Tuna Year Program)* com o objetivo de avaliar o estoque do patudo no Atlântico, bem como para expandir os conhecimentos sobre a biologia da espécie, tendo em vista que é uma das espécies de escombrídeos mais capturadas no Atlântico (ICCAT, 2005).

A alta capacidade migratória e a endotermia requerem alto consumo metabólico, fazendo com que os tunídeos se alimentem de uma grande quantidade de itens variados, como crustáceos, peixes, moluscos e poliquetas, que atuam como hospedeiros intermediários e paratênicos de várias espécies de helmintos (Madhavi & Ram, 2000), principalmente aqueles pertencentes à família Didymozoidae Monticelli, 1888 que, de acordo com registros na literatura, são os principais parasitos de atuns e afins (Pozdnyakov, 1996; Pozdnyakov & Gibson, 2008).

1.2 Família Didymozoidae

Os trematódeos pertencentes à família Didymozoidae representam um grupo de parasitos que usualmente vivem encistados aos pares nos tecidos de teleósteos marinhos, principalmente Scombridae, sendo raramente encontrados parasitando peixes de água doce. Caracterizam-se como um grupo diferente dos demais Digenea pela morfologia e vida parasitária altamente adaptável, além de parasitarem

sítios pouco comuns como brânquias, pele, ossos, cavidades nasal, oral e orbital, sistema vascular, rins, tecidos conectivo, muscular e adiposo, entre outros. A maioria das espécies dessa família é hermafrodita, porém, algumas espécies apresentam sexos separados. O corpo apresenta uma forma bem diversificada, sendo frequentemente dividido em duas regiões distintas, a anterior usualmente delgada, enquanto que a região posterior é mais larga que a anterior, podendo ser expandida ou achatada, multilobada e até mesmo filiforme (Yamaguti, 1970; Pozdnyakov & Gibson, 2008, Justo & Kohn, 2014).

As primeiras espécies conhecidas de didimozoídeos foram descritas por Rudolphi (1819), sendo que sua organização taxonômica só foi então realizada 69 anos mais tarde por Monticelli (1888), que então criou a família Didymozoonidae. A nomenclatura foi corrigida por Poche (1907), o que levou a indicação do mesmo como autor da família. No entanto, seguindo as normas da *International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN)*, concluiu-se que a autoria da família Didymozoidae pertence a Monticelli, que foi o primeiro a distinguir o grupo como uma família.

Segundo Pozdnyakov e Gibson (2008), diversos autores tentaram organizar o táxon posteriormente (Braun, 1893; MacCallum, 1917; Dollfus, 1926), até que em 1935, Ishii desenvolveu um grande trabalho sobre a fauna de didimozoídeos, que abrange trabalhos com material original e dados da literatura. Como resultado, nesta revisão foram propostas novas subfamílias e gêneros, além da descrição de novas espécies.

Posteriormente, Yamaguti (1958, 1965, 1970, 1971) expandiu o táxon para 23 subfamílias e 75 gêneros, além de trabalhos importantes como os de Skrjabin (1955), Mamaev (1968), Nikolaeva (1968, 1975, 1978, 1980 a,b, 1985) e Pozdnyakov (1987, 1989, 1990a, 1993) serem publicados, contribuindo para um maior entendimento do grupo.

Em 1979, Gibson e Bray revisaram a superfamília Hemiuroidea Looss, 1899 e consideraram os didimozoídeos pertencentes a uma superfamília a parte, Didymozooidea. Porém, em 1996 Gibson incluiu o grupo com uma família dentro de Hemiuroidea, o que foi confirmado por Barker et al. (1993) em seus estudos moleculares.

Pozdnyakov (1996) propôs que os didimozoídeos deveriam ser organizados em duas famílias, sendo uma delas para indivíduos monóicos e outra para dióicos.

Pozdnyakov e Gibson (2008) seguiram o sistema proposto por Pozdnyakov (1996), com exceção da divisão do táxon em duas famílias, mantendo o grupo em uma família, Didymozoidae, como proposto por Gibson (1996).

O ciclo de vida completo dos didimozoídeos não é conhecido. Entretanto acredita-se que seja semelhante aos dos demais indivíduos da superfamília Hemiuroidea. Segundo Nikolaeva (1985), o primeiro estágio do ciclo é o menos elucidado, já as metacercárias são encontradas em peixes, lulas, crustáceos e outros invertebrados presentes na alimentação de tunídeos.

Parte do ciclo de vida de muitos didimozoídeos envolve a morte de um adulto no tecido do hospedeiro e a dispersão dos ovos, como descrito para *Nematobothrium spinneri* por Lester (1979). Outros mecanismos de dispersão seriam a predação (Noble, 1975; Lester, 1980) e a ulceração da parede do cisto e dispersão de adultos e ovos no ambiente (Timon-David, 1937; Lester, 1980).

No Japão, Kamegai (1971) registrou o didimozoídeo *Gonapodasmius* sp. na musculatura do peixe marinho *Cypselurus heterurus doderleini*, assim como ovos que se assemelham ao do parasito em fezes humanas, coincidindo o período de migração sazonal do peixe ao longo da costa do Pacífico do Japão à incidência sazonal dos ovos no homem. Chung & Cross (1975) encontraram ovos nas fezes em 41% das crianças de uma escola localizada na costa de Taiwan, que provavelmente foi adquirido pelo consumo de peixe marinho. De acordo com Nikolaeva (1985), os peixes podem conter metacercárias que poderiam se aclimatar ao intestino humano e iniciar migrações peculiares a estas larvas, podendo ser perigosas aos seres humanos. Carney et al. (1987) e Cross et al. (1989) também encontraram ovos entre outros helmintos em fezes humanas nas Filipinas. Pascual et al. (2006) registraram várias agregações de ovos de didimozoídeos encistados na musculatura de *Scomber scombrus*. Esses autores também sugeriram que uma infecção massiva por esses parasitos pode reduzir o valor comercial do peixe devido ao aspecto amarelo brilhante muito visível a olho nu. Traub et al. (2009) também encontraram ovos em fezes de crianças na Tailândia, cuja identificação foi confirmada através de análises moleculares, como sendo de didimozoídeos. Os autores sugerem que esses ovos foram eliminados mecanicamente pelas fezes, após o consumo de peixe contendo tais ovos na musculatura. A popularização da culinária oriental e o aumento do consumo de peixe cru ou mal cozido por muitos países da América do Sul sugere que estudos deste tipo devem ser realizados nestes países.

A grande importância econômica dos tunídeos no mundo faz com que vários autores realizem trabalhos taxonômicos que revelam a grande diversidade de espécies de Didymozoidae parasitando estes hospedeiros. No Brasil vários trabalhos foram realizados (Eiras & Rego, 1987; Justo, 2008; Justo & Kohn, 2005, 2008, 2009, 2010, 2012 a,b, 2014 a,b, 2015; Justo et al., 2008, 2009, 2013; Kohn & Justo, 2008; Kohn et al., 2001), bem como na Rússia (Pozdnyakov, 1987, 1989, 1990a,b, 1993, 1994, 1996), Japão e Havaí (Yamaguti, 1970, 1971), Índia (Nikolaeva & Tkachuk, 1982; Murugesu, 1995; Madhavi & Ram, 2000), Golfo do México (Nikolaeva, 1968), Mar Adriático (Mladineo & Tudor, 2004; Mladineo, 2006), entre outros. No entanto, estudos moleculares ainda são em menor número, podendo ser citados os de Anderson & Barker (1993, 1998) na Austrália, Pascual et al. (2006) na Espanha, Mladineo et al. (2010) no Mar Adriático, Abe et al. (2014) e Abe & Okamoto (2015) no Japão e Melo et al. (2013) no Brasil.

2 JUSTIFICATIVA

O conhecimento das comunidades de parasitos de determinada espécie ou população de peixe, particularmente aqueles que apresentam importância comercial, reveste-se de especial interesse, uma vez que estes dados poderão ser utilizados em conjunto com outros indicadores, a fim de colaborar para o conhecimento de padrões de migração, estruturação populacional e filogenia.

O advento do sequenciamento de DNA proporcionou, nas últimas duas décadas, a criação de bancos de dados genéticos visando reunir e disponibilizar informações genéticas de táxons do mundo todo. Essas coleções de sequências de DNA têm contribuído para a realização de pesquisas em diversas áreas, dentre elas taxonomia, sistemática, biologia da conservação e ecologia. A sistemática molecular está acelerando e contribuindo para a descrição de novas espécies e para o conhecimento da história evolutiva dos parasitos dos peixes. Os marcadores moleculares podem desenvolver papel importante na taxonomia, considerando a identificação das espécies crípticas, no estabelecimento de hipóteses filogenéticas e nos estudos de coespeciação e coevolução.

A classificação taxonômica dos Didymozoidae é considerada caótica e complexa, conseqüentemente, a adoção de técnicas de biologia molecular combinadas a estudos das características morfológicas vem cada vez mais desempenhando um papel fundamental na identificação e descrição de novas espécies e em estudos de relações filogenéticas entre os táxons.

Embora o Brasil seja um dos principais países pesqueiros de atuns, os estudos taxonômicos e moleculares de helmintos parasitos desses hospedeiros ainda são poucos. No Brasil, as pesquisas na família Didymozoidae tem se concentrado principalmente em descrições taxonômicas, registro de novos hospedeiros e novas distribuições geográficas, já tendo sido registradas 33 espécies, das quais somente uma foi estudada utilizando abordagens moleculares. Este fato demonstra a necessidade de se ampliar os estudos taxonômicos e moleculares, tendo em vista a ocorrência de várias espécies de atuns e afins na costa brasileira e a grande diversidade de espécies parasitas ainda não identificadas nesses hospedeiros.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a diversidade dos trematódeos pertencentes a família Didymozoidae coletados em *T. obesus* ocorrentes ao largo do litoral do estado do Rio de Janeiro, utilizando abordagens morfológicas e moleculares, contribuindo assim para o conhecimento da biodiversidade da fauna helmintológica do Brasil.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar e caracterizar morfometricamente as espécies de Didymozoidae parasitos de *T. obesus* utilizando técnicas de microscopia de luz.
- Caracterizar o perfil molecular das espécies de Didymozoidae parasitos de *T. obesus*.
- Avaliar a região intergênica ITS como ferramenta de identificação taxonômica para as espécies pertencentes a família Didymozoidae.
- Realizar uma análise comparativa dos perfis genéticos das espécies encontradas de Didymozoidae com espécies previamente depositadas no GenBank.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Hospedeiros

4.1.1 *Coleta dos hospedeiros*

Os peixes foram adquiridos diretamente de comerciantes no período de 02/2017 a 05/2018 no Mercado Municipal de São Pedro, em Niterói, Rio de Janeiro, onde são encontrados atuns pescados ao largo da costa do Estado do Rio de Janeiro. Após a aquisição, os peixes foram acondicionados em caixas de isolamento térmico contendo gelo, a fim de garantir as boas condições de conservação e preservá-los durante o transporte ao Laboratório de Helmintos Parasitos de Peixes (LHPP), do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

4.1.2 *Identificação e análise dos hospedeiros*

Os hospedeiros foram identificados de acordo com Collete & Nauen (1983) e em seguida foram pesados com o uso de balança digital (Filizola, Beyond Technology) e medidos, quando foram tomadas as medidas do comprimento total (medida entre a ponta do focinho e a extremidade da nadadeira caudal), comprimento zoológico (medida entre a ponta do focinho e a extremidade da coluna vertebral) e comprimento padrão ou furcal (distância entre a ponta do focinho e a extremidade dos raios médios da nadadeira caudal).

4.2 Parasitos

4.2.1 *Coleta e processamento*

Inicialmente, os peixes passavam por uma inspeção macroscópica de toda superfície corporal, bem como dos raios das nadadeiras, narinas, brânquias, e cavidade bucal, para observação e coleta de possíveis parasitos presentes nestas regiões.

Para coleta dos parasitos nos órgãos internos, foi feita uma incisão longitudinal com auxílio de bisturi, do ânus em direção à cabeça, com o objetivo de expor todo o conteúdo da cavidade visceral dos peixes. Os órgãos foram retirados e

separados em placas de Petri contendo solução salina fisiológica 0,85%. Depois de separados, os órgãos foram abertos com auxílio de tesoura de ponta fina para exposição do conteúdo interno. Todo este conteúdo foi lavado em peneira de 10 cm de diâmetro e malha de 154 µm. Os parasitos retirados na peneira foram então colocados em placas de Petri com solução salina fisiológica 0,85%. Para helmintos encistados nas vísceras, musculatura, brânquias, nadadeiras, tegumento, cavidades oral e palato, foram utilizadas agulhas finas para dissecação do cisto com auxílio de microscópio estereoscópio e logo que liberados do cisto foram também colocados em solução salina fisiológica 0,85%. Para análise morfológica, os helmintos foram fixados com ou sem compressão entre lâmina e lamínula em AFA (93 partes de etanol 70%, 5 partes de formalina e 2 partes de ácido acético glacial) frio (Eiras et al.,2006). Os parasitos fixados foram corados com carmim clorídrico de Langeron, desidratados em série alcoólica e clarificados com óleo de cravo. A montagem permanente das lâminas foi feita com bálsamo do Canadá.

Para a análise molecular, os parasitos foram acondicionados em tubos de microcentrífuga contendo 200 µl de água ultra Milli-Q autoclavada e congelados a 4° C.

4.2.2 Análise morfológica

4.2.2.1 Morfometria e imagens

As medidas dos helmintos foram realizadas utilizando-se ocular micrométrica, apresentadas em micrômetros, exceto quando especificado. São apresentadas as variações das medidas seguidas de suas respectivas médias entre parênteses e o número de estruturas medidas especificado quando diferente do apresentado entre colchetes. As fotomicrografias foram realizadas usando-se câmera acoplada ao microscópio Axioskop ou microscópio estereoscópio, ambos da marca Zeiss. Todas fotografias deste trabalho onde a autoria não é indicada são originais (Justo & Kohn, 2012a).

4.2.2.2 Classificação taxonômica e determinação dos parasitos

A organização taxonômica dos helmintos foi realizada segundo Gibson et al. (2002), Jones et al. (2005), Bray et al. (2008), Yamaguti (1970, 1971) e Pozdnyakov

& Gibson (2008). A identificação específica dos parasitos foi feita utilizando-se chaves taxonômicas e trabalhos originais para cada espécie.

4.2.3 Análise molecular

4.2.3.1 Amostras

As análises moleculares do estudo foram realizadas no Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos (LABTRIP), do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro. O número de espécimes de parasitos de cada espécie separados para análise variou de 1 a 4. Todas as amostras receberam um número de identificação (ID) conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Didimozoídeos coletados em *Thunnus obesus* e seus respectivos números de identificação (ID).

ID	Espécie
DI01	<i>Koellikerioides internogastricus</i>
DI02	<i>Koellikerioides internogastricus</i>
DI03	<i>Koellikerioides intestinalis</i>
DI04	<i>Didymocystis lamotheargumedei</i>
DI05	<i>Didymosulcus philobranthiarca</i>
DI06	<i>Koellikerioides internogastricus</i>
DI07	<i>Didymocystis neothunni</i>
DI08	<i>Koellikerioides internogastricus</i>
DI09	<i>Didymocystis lamotheargumedei</i>
DI10	<i>Platocystis vivipara</i>
DI11	<i>Platocystis vivipara</i>
DI12	<i>Platocystis vivipara</i>
DI13	Didymozoidae gen. sp. 1
DI14	Didymozoidae gen. sp. 1
DI15	<i>Didymosulcus philobranthiarca</i>

4.2.3.2 Extração do DNA

Para realizar o processo de digestão física das amostras, as mesmas foram submetidas a nitrogênio líquido para a quebra e após macerados com pistilo. O procedimento de extração química consistiu na adição de 30 µL de Proteinase K [20ng/ml] (Invitrogen, Carlsbad, California), seguido da aplicação do Kit DNeasy Plant Mini (Qiagen) segundo as modificações descritas em Simões et al. (2017).

As concentrações de DNA foram estimadas a absorvância de 260nm em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). As amostras foram submetidas ao processo de tratamento por meio de polimerização reconstrutora para resultados de PCR negativos ou para aumentar volume de DNA, seguindo condições descritas por Golemberg et al. (1996).

4.2.3.3 Reação em cadeia de polimerase e sequenciamento nucleotídico

O alvo genético utilizado para a identificação molecular foi o fragmento ITS2 (internal transcribed spacer 2) do DNA ribossomal dos parasitos (Tabela 2).

Tabela 2. Definições do alvo genético e primers utilizados neste estudo.

Alvo	Tamanho	Primers	Referência
ITS2	~300 a	NC13 F (5'-ATCGATGAAGAACGCAGC-3')	Zhu et al. (1998)
	700 pb	NC2 R (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3')	

As amplificações do alvo trabalhado foram realizadas por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR). As reações foram realizadas com um volume final de 25 µl sendo composto por 2U de *Platinum®Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), 1X de Buffer, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 200ng de cada primer, 10 a 50 ng/µl de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler Nexus* (Eppendorf), programado para uma ciclagem de um passo inicial de desnaturação a 96°C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos de 40 segundos a 96°C, 40 segundos a 55°C e 40 segundos a 72°C e extensão de 5 minutos a 72°C.

Para a eletroforese, 8µL de produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 2%. Após a corrida, o gel foi visualizado em transluminador de luz

ultravioleta. Os produtos foram então purificados com o *Kit CleanSweep PCR Purification Reagent* (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) seguindo o protocolo dos fabricantes.

Os produtos de PCR obtidos foram sequenciados, utilizando o Kit *Big Dye Terminator* v. 3.1 (Applied Biosystems) e a plataforma de sequenciamento Fiocruz (Sequenciador Applied Biosystems ABI 3730).

4.2.3.4 Análise das sequências

As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa SeqMan v. 7.00 - DNASTAR Lasergene (Madison Wisconsin, EUA). A análise das sequências foi feita pelo uso de comando Pairwise/Blast/NCBI, Clustal W v.1.4 (Thompson et al., 1994) e o programa BioEdit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). As distâncias genéticas intraespecíficas, interespecíficas e intergênero entre as sequências foram calculadas usando o banco de dados disponível no GenBank (08/2018) das espécies *Didymocystis semiglobularis*, *D. pectoralis*, *D. bifasciatus*, *Didymosulcus wedli*, *D. irregulares*, *D. palati*, *D. spirocauda*, *Platocystis alalongae*, *Koellikerioides apicalis*, *Koellikeria globosa* e *Koellikeria* sp 'renalis' no programa MEGA v. 7 (Kumar et al., 2011) utilizando o modelo *p-distance* segundo Mladineo et al. (2010).

As sequências geradas neste estudo foram submetidas ao GenBank.

5 RESULTADOS

5.1 Biometria e pesagem do hospedeiro

No total foram examinados 12 exemplares de *Thunnus obesus* (Fig. 2) com o peso variando de 3,015 a 5,215 kg. O comprimento total dos hospedeiros variou de 60 a 72 cm, o comprimento zoológico de 53 a 62 cm e o comprimento padrão de 53 a 64 cm.

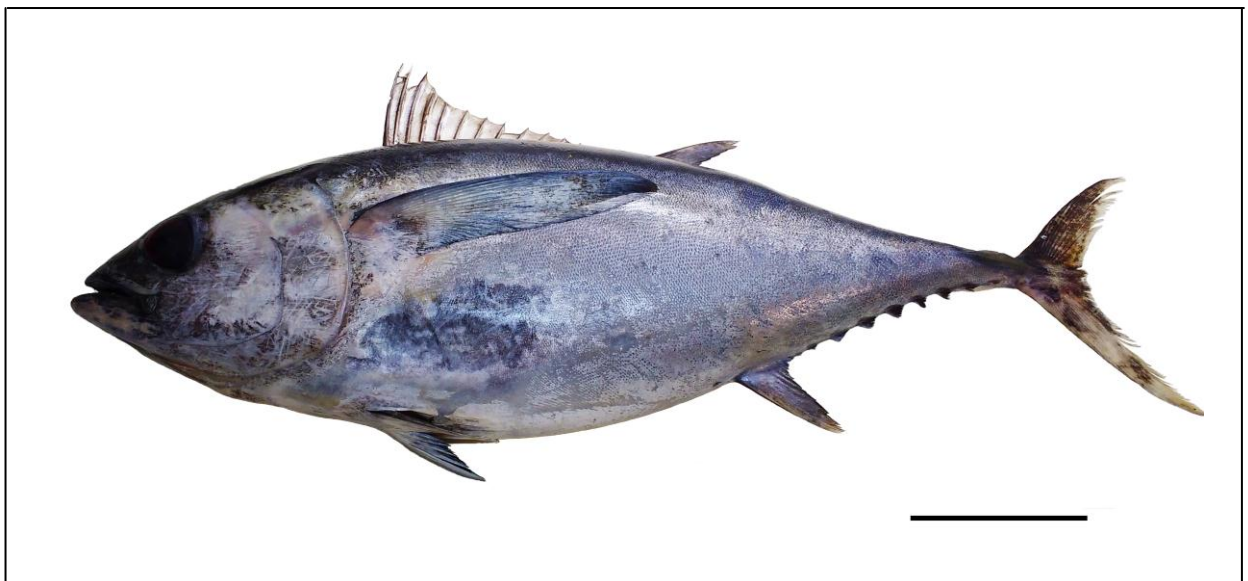


Figura 2: *Thunnus obesus* (Lowe,1839). Barra: 10 cm

5.2 Análises morfológicas

Todos os peixes examinados estavam parasitados por pelo menos uma espécie de helminto pertencente à família Didymozoidae.

De acordo com a análise morfológica, os didimozoídeos foram classificados em oito espécies distintas, que são descritas a seguir:

Trematoda Rudolphi, 1808

Digenea Carus, 1863

Plagiorchiida La Rue, 1957

Hemiurata Skrjabin & Guschanskaja, 1954

Hemiuroidea Looss, 1899

Didymozoidae Monticelli, 1888

Didymozoinae Monticelli, 1888

***Didymocystis* Yamaguti, 1970**

5.2.1 *Didymocystis lamotheargumedei* Kohn & Justo, 2008 (Figs. 3 e 4)

Hospedeiro: *Thunnus obesus* (Lowe, 1839)

Sítio de infecção: Opérculo (Fig. 3A) e palato (Fig. 3B).

Localidade: Costa do estado do Rio de Janeiro.

Prevalência: 33,3%

Intensidade Média: 103

Abundância Média: 34,3

Adultos (Fig. 2C, 3D)

Descrição (baseada em 10 espécimes): Cistos arredondados com uma rígida parede esclerotizada originária do hospedeiro, contendo dois indivíduos hermafroditas, similares em forma e tamanho. Corpo dividido em duas regiões distintas. Região anterior delgada, saindo do lado ventral da parte anterior da região posterior, medindo 0,8 – 1,67 (1,30) mm x 0,3 – 0,47 (0,37) mm. Região posterior ventralmente côncava, medindo 1,67 – 2,80 (2,30) mm x 1,02 – 1,95 (1,55) mm. Ventosa oral terminal, piriforme 35 – 62 (54) x 22 – 37 (34), seguida diretamente por uma faringe globular medindo 30 – 41 (36) de diâmetro. Ventosa ventral ausente. Esôfago 500 – 950 (689) de comprimento. Cecos intestinais estreitos na região anterior e inflados e retorcidos na região posterior. Testículos tubulares estendendo-se ao longo das margens anteriores da região posterior do corpo, medindo 490 – 1.175 (889) x 100 – 275 (155) [n=7]. Ovário dividido em 4 ramos tubulares medindo 40 – 80 (63) de largura que se estendem através das margens laterais da região posterior. Receptáculo seminal medindo 110 – 280 (183) x 82 – 210 (152) [n=7].

Glândula vitelínica dividida em 5 a 7 túbulos que não se ramificam, medindo 50 – 100 (65) de largura. Glândula de Mehlis presente. Útero ocupando toda a área central da região posterior do corpo. Ovos pequenos operculados medindo 12 – 20 (16) x 7 – 12 (9) [n=100].

Três formas imaturas, uma identificada como tipo estrutural *Anacetabulum* descrita por Kurochkin & Nikolaeva, 1978, uma em estágio intermediário entre *Anacetabulum* e jovens adultos e a terceira em estágio jovem com órgãos reprodutores em desenvolvimento foram encontradas livremente associadas a formas adultas no mesmo sítio de infecção em três dos 12 *T. obesus* examinados.

***Anacetabulum* Kurochkin & Nikolaeva, 1978 (Fig. 3A)**

Descrição baseada em 5 espécimes: Corpo lanceolado 3,42 – 4,85 (4,00) mm x 0,25 – 0,37 (0,29) mm; ventosa oral 40 – 62 (52) x 30 – 37 (35) seguida diretamente pela faringe 29 – 30 (30) x 30 – 35 (33). Cecos intestinais inflados e torcidos ao longo do corpo.

Jovens (estágio intermediário entre *Anacetabulum* e jovens adultos) (Fig. 3B)

Descrição baseada em cinco espécimes: Corpo começa a tomar a forma de adulto, já se diferenciando em duas regiões distintas: região anterior subcilíndrica, medindo 0,69-1,43 (1,14) mm x 0,24-0,30 (0,28) mm e região posterior oval 1,05-1,45 (1,28) mm x 0,46-0,80 (0,65) mm. Ventosa oral 35-48 (42) x 23-35 (28); faringe 21-32 (26) x 25-35 (30); cecos inflados e apresentando constrictões ao longo, com conteúdo digestivo.

Jovens adultos (Fig. 3C)

Descrição baseada em 6 espécimes: Região anterior afilada 0,97 - 1,30 (1,10) mm x 0,22 - 0,32 (0,28) mm. Região posterior globular a oval 1,27 - 1,57 (1,48) mm x 0,60 - 0,92 (0,77) mm. Ventosa oral 52 - 57 (56) x 25 - 37 (34) seguida diretamente pela faringe, 35 - 37 (35) em diâmetro. Cecos retorcidos, inflados e com

constricções. Testículos filiformes, pareados. Órgãos reprodutores femininos apresentam o padrão definitivo de arranjo, exceto pela ausência de ovos no útero, que é característica de adultos. Poro genital lateral a ventosa oral.

Comentários

Didymocystis lamotheargumedei foi descrita por Kohn & Justo (2008) parasitando o opérculo e palato de *Thunnus atlanticus*, o palato de *Thunnus albacares* e o opérculo de *Katsuwonus pelamis*, no oceano Atlântico, Brasil. Neste trabalho esta espécie é pela primeira vez assinalada parasitando o palato e o opérculo de *T. obesus*, representando um novo hospedeiro. Os espécimes de *D. lamotheargumedei* aqui estudados estão de acordo com as características morfométricas da descrição original.

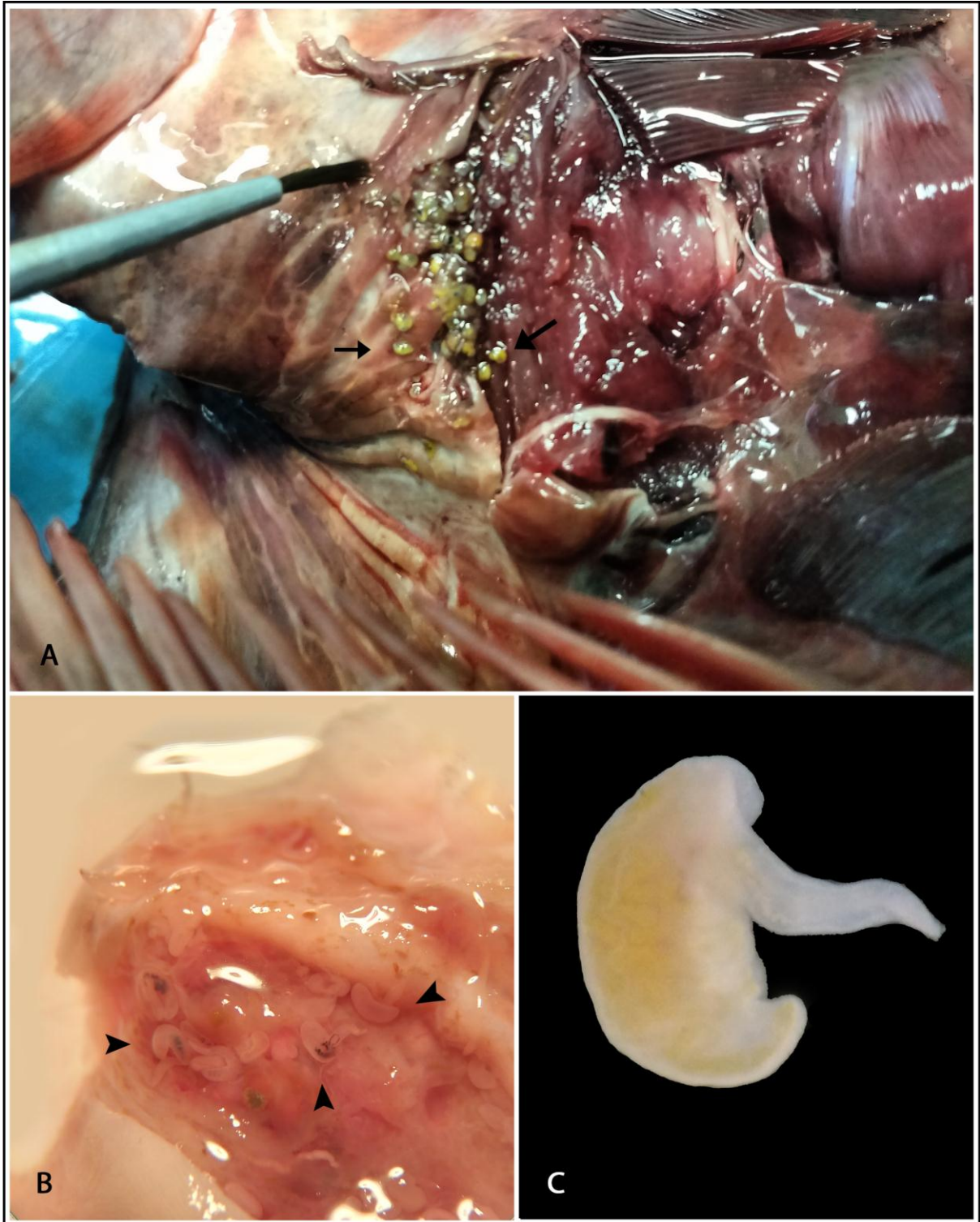


Figura 3: *Didymocystis lamotheargumedei* Kohn & Justo, 2008. **A.** Fotografia dos espécimes (seta preta) no opérculo de *Thunnus obesus*. **B.** Fotografia dos espécimes (ponta de seta) no palato de *Thunnus obesus*. **C.** Fotomicrografia do espécime adulto, total, sem compressão.

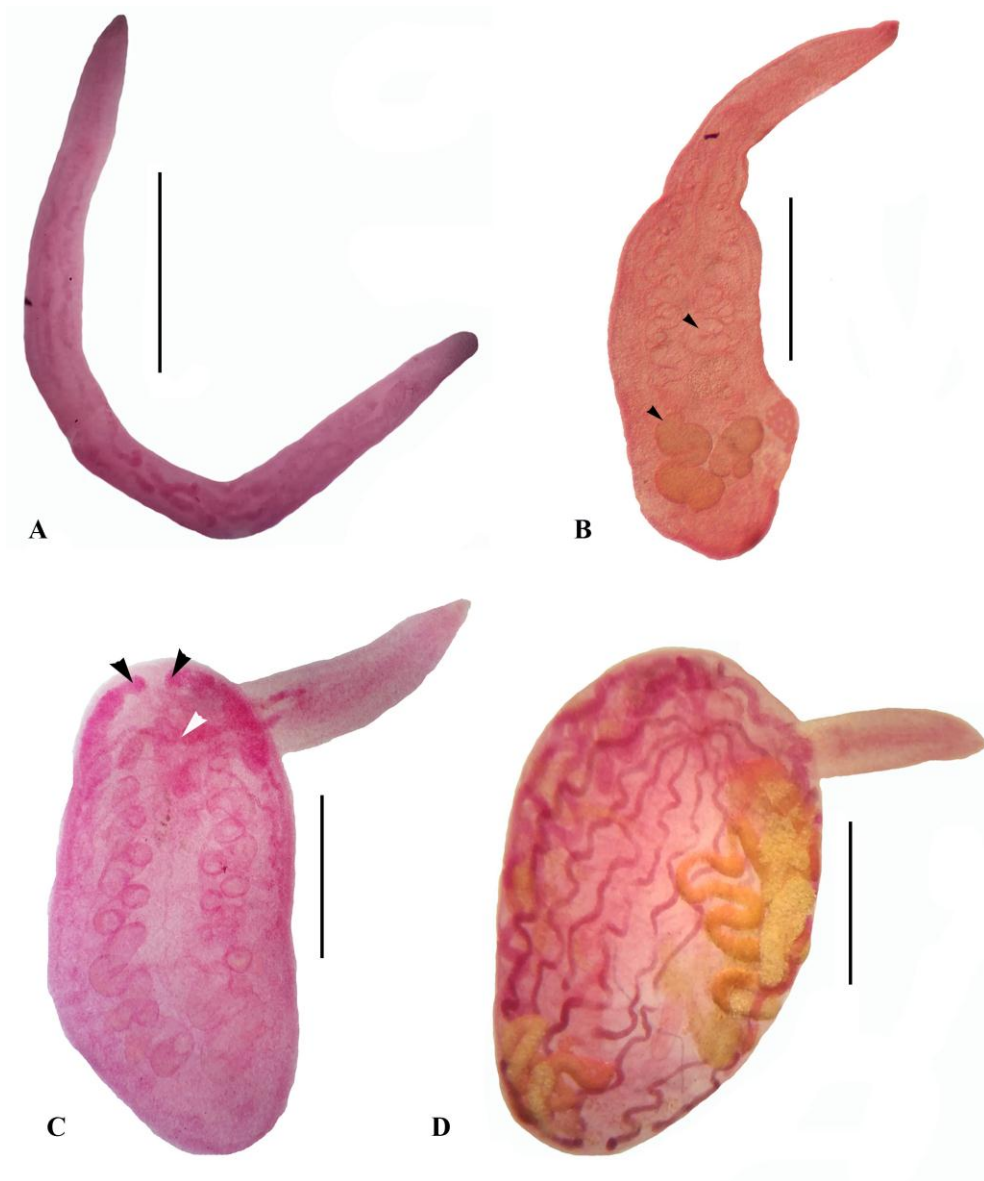


Figura 4: Fotomicrografias de *Didymocystis lamotheargumedei* Kohn & Justo, 2008. **A.** Total, estágio larval (tipo estrutural) *Anacetabulum* Kurochkin & Nikolaeva, 1978. Barra: 1mm. **B.** Total, jovens (estádio intermediário entre *Anacetabulum* e jovens adultos) mostrando o ceco retorcido com conteúdo digestivo (ponta de seta). Barra: 0,8 mm. **C.** Total, jovem adulto mostrando testículos filiformes, pareados (ponta de seta preta), e formação inicial da junção genital, apresentando o padrão definitivo do arranjo dos órgãos reprodutores (ponta de seta branca). Barra: 0,8 mm. **D.** Total, adulto, comprimido. Barra: 0,8 mm.

5.2.2 *Didymocystis neothunni* (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1996 (Fig. 5)

Sin: *Univitellodidymocystis neothunni* Yamaguti, 1970

Hospedeiro: *Thunnus obesus* (Lowe, 1839)

Sítio de infecção: Opérculo.

Localidade: Costa do estado do Rio de Janeiro.

Prevalência: 8,3%

Intensidade Média: 2

Abundância Média: 0,16

Descrição (baseada em 1 espécime): Cisto arredondado contendo dois indivíduos hermafroditas, similares em forma e tamanho. Corpo dividido em duas regiões distintas. Região anterior 3,95 x 1,125 mm, espatulada, ligada a parte ventral da região posterior do corpo. Região posterior hemisférica achatada ventralmente e convexa dorsalmente, medindo 4,15 x 3,35 mm. Extremidade posterior mais afilada e curvada ventralmente. Boca com abertura ventro-terminal; ventosa oral subglobular, muscular 230 x 210. Faringe ausente. Esôfago simples, longo, medindo 1.387 x 37. Cecos intestinais em parte localizados na região anterior, onde são mais estreitos, alargando-se na região posterior do corpo, terminando um de cada lado em diferentes níveis. Dois testículos tubulares medindo 137 de largura, localizados um de cada lado da região posterior do corpo. Canal deferente caminhando ao lado do metraterma ao longo da região anterior do corpo. Poro genital ventral a ventosa oral. Ovário tubular, fino, medindo 90 de largura, enrolado e estendendo-se um de cada lado, longitudinalmente no campo testicular, da extremidade anterior da região posterior até a uma distância curta da extremidade posterior dos testículos. Receptáculo seminal alongado medindo 282 x 152. Glândula vitelínica única, tubular, não ramificada, longa, medindo 80 de largura, originada na extremidade posterior da região posterior do corpo. Metraterma muscular e contorcido. Ovos embrionados medindo 17 x 12 [n=10].

Comentários

Didymocystis neothunni foi descrita originalmente por Yamaguti (1970) como *Univitellodidymocystis neothunni* parasitando o maxilar de *T. albacares* (= *Parathunnus sibi*) e *T. obesus* (= *Parathunnus sibi*) no Havaí. Pozdnyakov (1990b) referiu *Univitellodidymocystis neothunni* parasitando o mesmo sítio de infecção em *Thunnus thynnus*, entretanto, Pozdnyakov (1990a) fez uma grande revisão do genero *Didymocystis* e considerou os gêneros *Coeliodidymocystoides*, *Didymocystoides* e *Univitellodidymocystis* sinônimos deste. Posteriormente em 1996, este mesmo autor faz uma nova combinação, *Didymocystis neothunni*.

Esta espécie foi registrada por Justo & Kohn (2012b) pela primeira vez na América do Sul parasitando a língua de *T. atlanticus* no Brasil. O presente espécime apresenta as mesmas características morfométricas da descrição original e de estudos posteriores. Esta é a primeira vez que *D. neothunni* é registrada em *T. obesus* no Brasil, região do Atlântico Sul Ocidental.

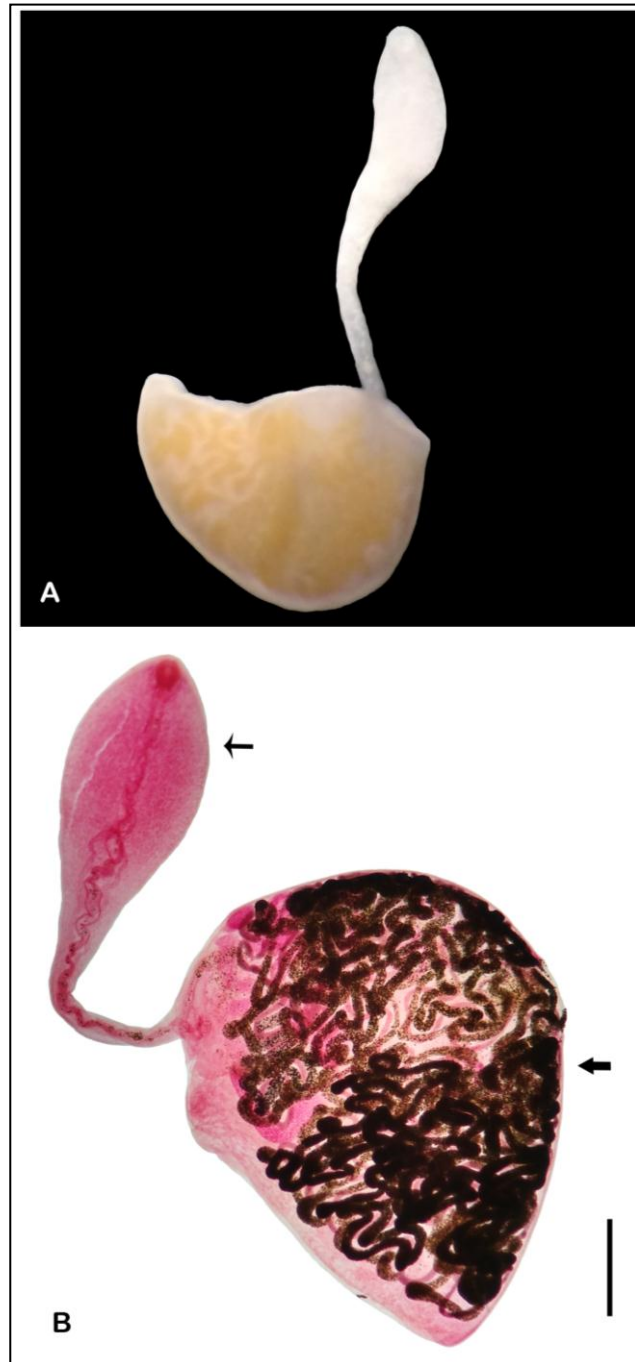


Figura 5: Fotomicrografias de *Didymocystis neothunni* (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1996 parasito de *Thunnus obesus*. **A.** Espécime fora do cisto, sem compressão. **B.** Espécime comprimido e corado apresentando região anterior (seta fina) e região posterior (seta grossa). Barra: 1mm.

5.2.3 *Didymosulcus philobranchiarca* (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1990 (Fig. 6)

Sin: *Didymocystis philobranchiarca* Yamaguti, 1970

Hospedeiro: *Thunnus obesus* (Lowe, 1839)

Sítio de infecção: Palato (6A) e brânquias.

Localidade: Costa do estado do Rio de Janeiro.

Prevalência: 25%

Intensidade Média: 22,6

Abundância Média: 5,6

Descrição (baseada em 10 espécimes): Cistos arredondados amarelo brilhante contendo dois indivíduos hermafroditas, similares em forma e tamanho. Corpo dividido em duas regiões distintas. Região anterior afilada 0,67 – 1,47 (1,04) mm x 0,15 – 0,2 (0,17) mm ligada na parte anterior da região posterior do corpo entre dois lobos. Região posterior em forma de vírgula medindo 3,05 – 5,15 (4,30) mm x 1,10 – 2,15 (1,59) mm, apresentando um sulco longitudinal que divide a porção anterior em dois lobos distintos. Boca terminal. Ventosa oral terminal e piriforme 45 – 50 (49) x 35 – 37 (36) seguida por uma faringe subcilíndrica 35 – 47 (41) x 30 – 47 (44). Esôfago simples medindo 400 – 750 (510) [n=8] de comprimento. Cecos intestinais estreitos na região anterior, um deles podendo ser completamente atrofiado e o outro tubular, expandindo-se na região posterior. Testículos tubulares, curvados, medindo 650 – 1.130 (931) x 130 – 230 (175) [n=9] situados quase simetricamente na porção anterior dos lobos da região posterior. Canal deferente caminhando ao lado do metraterma na região anterior do corpo. Poro genital ventro-lateral a ventosa oral. Ovários tubulares medindo 60 – 120 (82) [n=9] de largura. Receptáculo seminal presente. Glândula vitelínica com três ramos medindo 60 – 80 (68) de largura. Útero sinuoso, ocupando todo o espaço da região posterior do corpo. Ovos medindo 15 – 17 (16) x 9 – 10 (10) [n=100].

Comentários

Didymosulcus philobranchiarca foi descrito originalmente por Yamaguti (1970) como *Didymocystis philobranchiarca* parasitando os arcos branquiais de *T. albacares* (= *Neothunnus macropterus*) e *T. obesus* (= *Parathunnus sibi*) no Havaí. Essa espécie também foi registrada por Nikolaeva & Dubina (1985) tendo como sítio de infecção as brânquias de *Thunnus alalunga* e *T. obesus*. Poznyakov (1990a) descreveu o gênero *Didymosulcus* e considerou esta espécie como pertencente a este gênero. Justo et al. (2008) registraram *Didymosulcus philobranchiarca* parasitando o palato e arco branquial de *T. albacares* e *T. obesus* e no palato, arco branquial e opérculo de *T. atlanticus*.

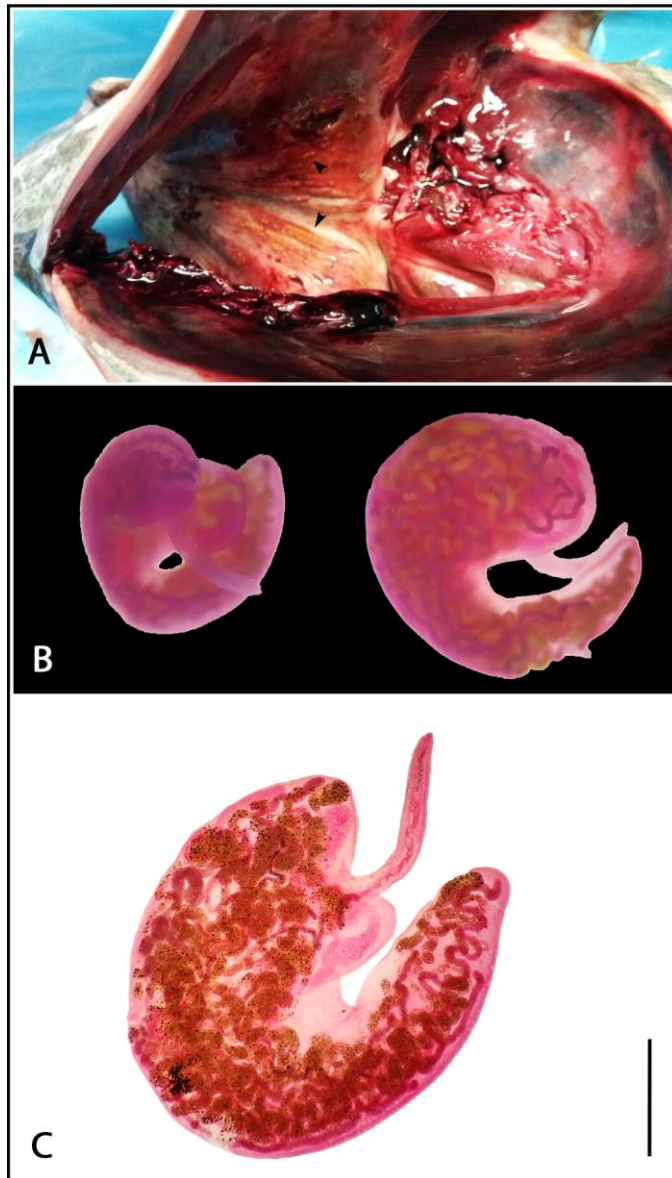


Figura 6: *Didymosulcus philobranchiarca* (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1990. **A.** Fotografia dos cistos (ponta de seta) no palato de *Thunnus obesus*. **B.** Fotomicrografias de exemplares corados por carmim clorídrico alcoólico, antes da montagem das lâminas. **C.** Fotomicrografia do espécime, após a montagem em lâmina. Barra: 800 μ m.

5.2.4 *Platocystis vivipara* (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1987 (Fig. 7)

Sin: *Dermatodidymocystis vivipara* Yamaguti, 1970

Hospedeiro: *Thunnus obesus* (Lowe, 1839)

Sítio de infecção: Tegumento da região dorsal (7A e 7B).

Localidade: Costa do estado do Rio de Janeiro.

Prevalência: 25%

Intensidade Média: 37,3

Abundância Média: 9,3

Descrição (baseada em 12 espécimes). Cistos discóides contendo dois indivíduos similares em forma e tamanho. Corpo dividido em duas regiões distintas, anterior e posterior. Região anterior afilada, porém, visivelmente espatulada em seu terço anterior, 0,37 – 0,72 (0,54) mm x 0,07 – 0,12 (0,1) mm [n=11] ligada próxima a extremidade anterior da margem plana na região posterior. Região posterior achatada semicircular ou reniforme 0,82 – 1,27 (1,14) mm x 0,45 – 0,80 (0,65) mm [n=11]. Ventosa oral terminal, fracamente muscular, piriforme 37 – 47 (44) x 22 – 27 (25) seguida diretamente por uma faringe rudimentar 17 – 26 (21) x 20 – 27 (21). Esôfago curto 85 – 205 (134) [n=9] de comprimento. Cecos intestinais curtos na região anterior, levemente inflados e torcidos na região posterior. Testículos alongados e tubulares, pareados, próximo a margem plana na parte inicial da região posterior do corpo, medindo 152 – 380 (294) x 45 – 120 (78) [n=8]. Poro genital ventrolateral a ventosa oral. Ovário tubular, retorcido, medindo 22 – 40 (29) [n=4] de largura, estendendo-se desde a extremidade distal da glândula vitelínica até a base da região posterior. Glândula vitelínica única, não ramificada, delgada, estendendo-se a partir do segundo terço ao longo da borda convexa da região posterior 1.020 – 2.060 (1644) x 40 – 100 (64) [n=11]. Receptáculo seminal presente. Útero ocupando toda a área central da região posterior do corpo, não formando reservatório de ovos. Ovos pequenos operculados, embrionados medindo 15 – 16 (15) x 8 – 11 (10) [n=120].

Comentários

Platocystis vivipara foi descrita originalmente no gênero *Dermatodidymocystis* por Yamaguti (1970) no Havaí parasitando o tegumento, especialmente da região dorsal, de *T. albacares* (= *Neothunnus macropterus*) e *T. obesus* (= *Parathunnus sibi*). Em 1987, Pozdnyakov publicou uma revisão do gênero, considerou *Dermatodidymocystis* sinônimo de *Platocystis* e fez a nova combinação. No presente trabalho, a ocorrência de *P. vivipara* é registrada pela primeira vez no Brasil e na América do Sul.

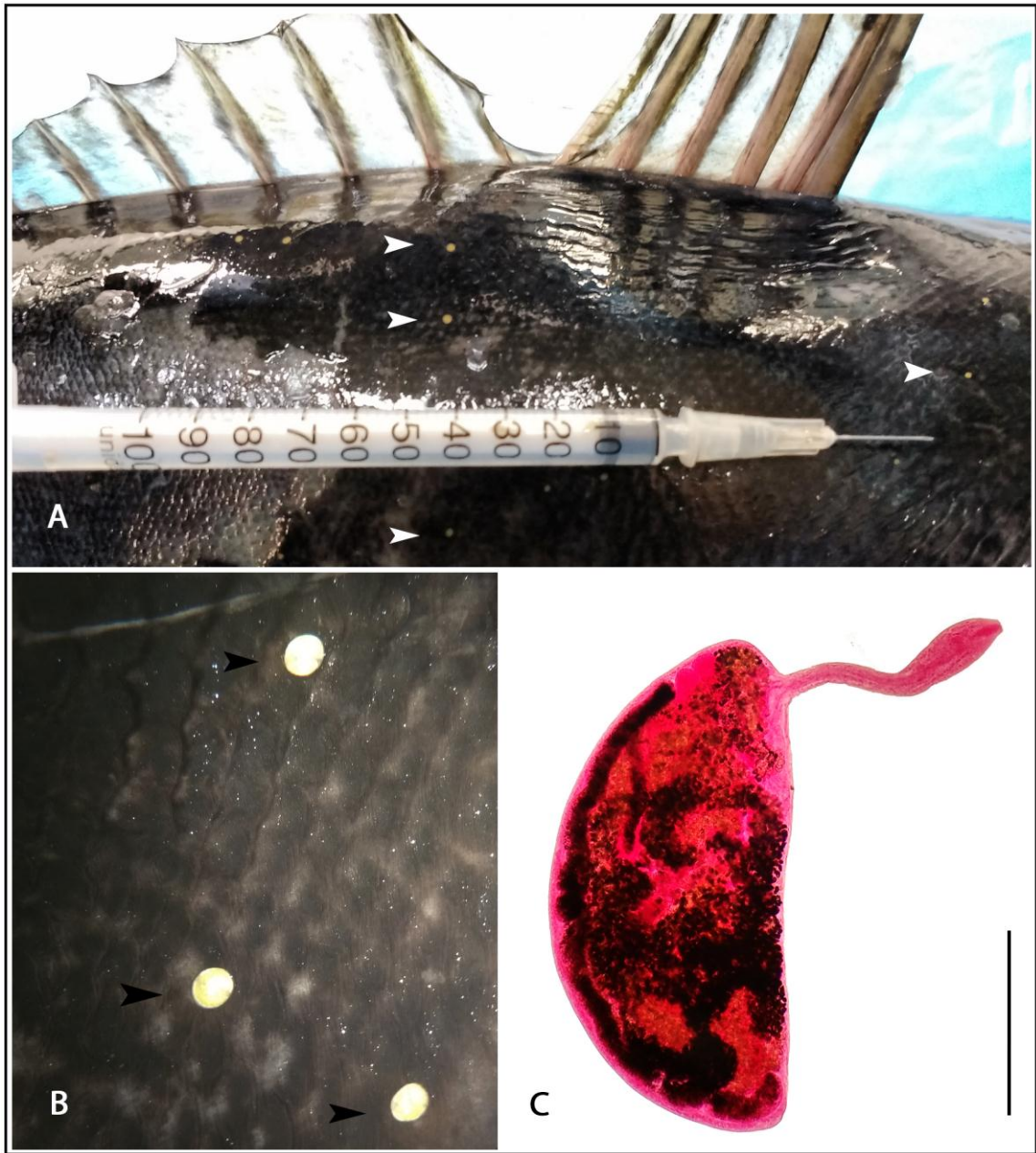


Figura 7: *Platocystis vivipara* (Yamaguti, 1970) Pozdnyakov, 1987. **A.** Fotografia dos cistos (pontas de seta branca) no tegumento dorsal de *Thunnus obesus*. **B.** Fotomicrografia com cistos em detalhe (pontas de seta preta). **C.** Fotomicrografia de exemplar corado, após a montagem em lâmina . Barra: 1mm.

Koellikeriinae Ishii, 1935

***Koellikerioides*, Yamaguti, 1970**

5.2.5 *Koellikerioides intestinalis* Yamaguti, 1970 (Fig. 8)

Hospedeiro: *Thunnus obesus* (Lowe, 1839)

Sítio de infecção: Parede interna do intestino.

Localidade: Costa do estado do Rio de Janeiro.

Prevalência: 25%

Intensidade Média: 8

Abundância Média: 2

Descrição (baseada em 4 machos e 5 fêmeas): Cistos arredondados amarelo brilhante contendo dois parasitos dióicos, ambos com o corpo dividido em região anterior e posterior distintas. Macho inserido na cavidade ventral no meio do corpo da fêmea. **Macho:** região anterior do corpo ligeiramente afilada e alargada na altura do esôfago 0,67 – 1,27 (0,89) mm x 0,20 – 0,57 (0,33) mm [n=3]. Ventosa oral terminal 110 – 120 (116) x 77 – 102 (91) [n=3], seguida por uma pequena faringe arredondada 42 – 45 (44) x 40 – 50 (46) [n=3]. Esôfago curto medindo 35 de comprimento. Região posterior arredondada, comparativamente menor que a da fêmea. Testículo único, alongado e curvado medindo 65 – 97 (84) [n=3] de largura. Canais deferentes originando-se de uma das extremidades do testículo, enrolados e abrindo em um poro ventral a ventosa oral. **Fêmea:** região anterior afilada e alargada na altura do esôfago 0,50 – 1,90 (1,17) mm x 0,22 – 0,80 (0,44) mm. Ventosa oral terminal e muscular 150 – 180 (160) x 127 – 150 (137), diretamente seguida por uma faringe globular 55 – 87 (66) x 67 – 87 (74). Esôfago curto medindo 30 – 77 (47) [n=4] de comprimento. Ceco estreito na região anterior e não visualizado na região posterior. Região posterior do corpo arredondada 0,77 – 1,42 (1,02) mm x 1,10 – 2,27 (1,78) mm. Ovário curto com ramos tubulares medindo 32 – 70 (48) [n=3] de largura. Receptáculo seminal presente. Glândula vitelínica medindo 27 – 60 (36) [n=4] de largura. Útero sinuoso ocupando toda a região posterior do corpo. Metraterma terminando em poro genital ventral a ventosa oral. Ovos embrionados medindo 15 – 80 (17) x 10 – 12 (10) [n=50].

Comentários

Koellikerioides intestinalis foi descrita originalmente por Yamaguti (1970) parasitando a parede interna do intestino de *T. obesus* (= *Parathunnus sibi*) no Havaí. A espécie foi registrada por Pozdnyakov (1990b) parasitando *T. alalunga*, *T. albacares* e *T. obesus* no Oceano Pacífico. Mladineo & Tudor (2004) e Mladineo & Bočina (2009) registram-na no Mar Adriático em *T. thynnus*. Justo & Kohn (2011) encontraram espécimes encistados na superfície interna do intestino de *T. albacares* e *T. obesus* e fizeram o registro em dois novos hospedeiros *T. atlanticus* e *Euthynnus alletteratus*.



Figura 8: Fotomicrografia de *Koellikeroides intestinalis* Yamaguti, 1970 parasito de *Thunnus obesus*. Região anterior da fêmea (ponta de seta) e região anterior do macho (seta). Barra: 400 μ m.

5.2.6 *Koellikerioides internogastricus* Yamaguti, 1970 (Fig. 9)

Hospedeiro: *Thunnus obesus* (Lowe, 1839)

Sítio de infecção: Parede interna do estômago.

Localidade: Costa do estado do Rio de Janeiro.

Prevalência: 50%

Intensidade Média: 28

Abundância Média: 14

Descrição (baseada em 10 espécimes): Cistos arredondados amarelo brilhante contendo dois parasitos dióicos, ambos com o corpo dividido em região anterior e posterior distintas. Macho inserido na cavidade ventral no meio do corpo da fêmea. **Macho:** região anterior do corpo ligeiramente afilada e alargada na altura do esôfago 0,50 – 2,02 (1,11) mm x 0,17 – 0,30 (0,26). Ventosa oral muscular 85 – 112 (102) x 65 – 97 (83) seguida diretamente por uma faringe pequena, arredondada e pouco muscular medindo 20 – 37 (33) x 22 – 45 (36). Esôfago sinuoso. Região posterior do corpo reniforme comparativamente menor que a da fêmea 350 – 400 (375) x 300 – 700 (500) [n=2]. Testículo único, alongado e curvado medindo 110 – 320 (194) [n=7] de largura. Canal deferente sinuoso e distendido 27 – 50 (36) [n=9] de largura abrindo em um poro ventral a ventosa oral. **Fêmea:** região anterior afilada e alargada na altura do esôfago 550 – 1.625 (980) x 250 – 425 (350). Ventosa oral muscular 140 – 197 (167) x 120 – 160 (145) seguida por uma faringe pouco muscular 32 – 70 (52) x 55 – 77 (69) [n=7]. Esôfago alongado. Ceco estreito na região anterior e não visualizado na região posterior. Região posterior arredondada medindo 1,47 – 3,30 (2,17) mm x 1,35 – 3,30 (2,26) mm. Ovário consistindo em um curto sistema medindo 50 – 80 (69) [n=8] de largura. Receptáculo seminal presente. Glândula vitelínica ramificada medindo 40 – 80 (55) de largura. Útero enrolado e ocupando toda a região posterior. Metraterma abrindo ventralmente a ventosa oral. Ovos embrionados medindo 12 – 17 (15) x 7 – 12 (9) [n=100].

Comentários

Koellikerioides internogastricus foi descrita originalmente por Yamaguti (1970) na parede interna do estômago de *T. albacares* (= *Neothunnus macropterus*) e *T. obesus* (= *Parathunnus sibi*) no Havaí. Justo et al. (2009) registraram-na em *T. atlanticus*, *T. albacares* e *T. obesus* na costa do Rio de Janeiro, Oceano Atlântico na mucosa e submucosa do estômago das três espécies hospedeiras.

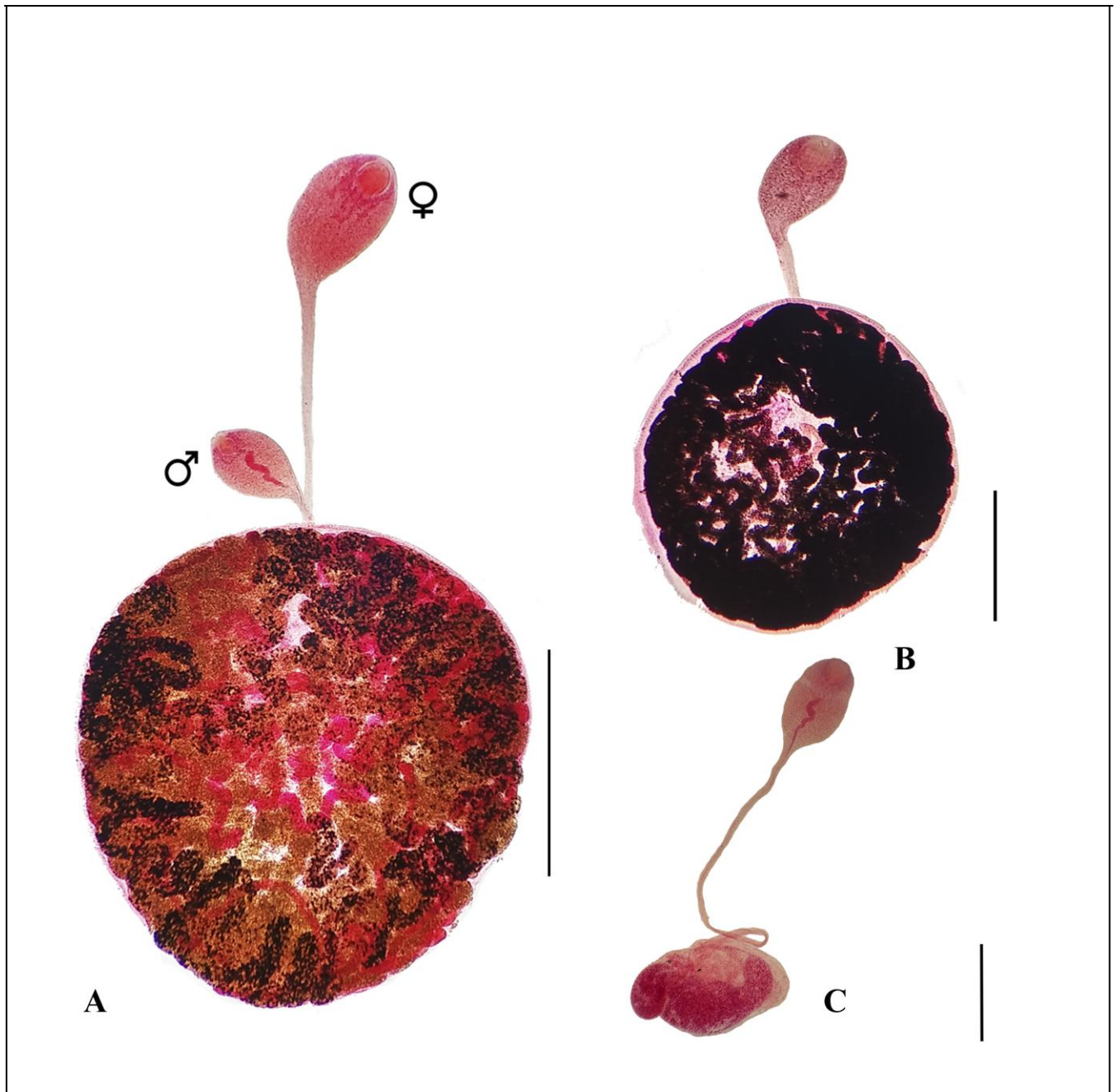


Figura 9: Fotomicrografias de *Koellikerioides internogastricus* Yamaguti, 1970 parasito de *Thunnus obesus*. **A.** Macho e fêmea. Barra: 1mm. **B.** Fêmea. Barra: 700µm. **C.** Macho. Barra: 500µm.

5.2.7 Didymozoidae gen. sp. 1

Hospedeiro: *Thunnus obesus* (Lowe, 1839)

Sítio de infecção: Tegumento da nadadeira caudal.

Localidade: Costa do estado do Rio de Janeiro.

Prevalência: 16,6%

Intensidade Média: 30,5

Abundância Média: 5,1

Descrição (baseada em 5 espécimes): Corpo dividido em duas regiões distintas, anterior e posterior. Região anterior afilada e levemente mais alargada na altura do esôfago medindo 0,35 – 0,82 (0,62) mm x 0,1 – 0,12 (0,11) mm e ligada a região posterior reniforme 1,05 – 1,17 (1,09) mm x 0,55 – 0,65 (0,58) mm. Ventosa oral piriforme 55 – 60 (58) x 32 – 37 (35), seguida por uma faringe fracamente muscular 22 – 25 (23) x 22 – 30 (27). Esôfago medindo 130 – 147 (137) de comprimento. Útero sinuoso ocupando toda a região posterior do corpo. Ovos embrionados 12 – 17 (15) x 7 – 12 (10) [n=50].

Comentários

Para a classificação taxonômica é necessária a análise de um número maior de exemplares. A morfometria dos exemplares estudados não está de acordo com as espécies conhecidas até o presente e estudos complementares são necessários para determinar se trata-se de uma espécie ainda não descrita.

5.2.8 Didymozoidae gen. sp. 2

Hospedeiro: *Thunnus obesus* (Lowe, 1839)

Sítio de infecção: Filamentos branquiais.

Localidade: Costa do estado do Rio de Janeiro.

Prevalência: 8,3

Intensidade Média: 4

Abundância Média: 0,3

Descrição (baseada em 5 espécimes): Corpo dividido em duas regiões distintas, anterior e posterior. Região anterior bem afilada e alargada na altura do esôfago 2,22 – 3,85 (3,04) mm x 0,35 – 0,45 (0,38) mm [n=4] seguida por uma região posterior alongada 6,45 – 9,90 (7,85) mm x 0,47 – 0,97 (0,64) mm [n=3]. Ventosa oral 100 – 120 (115) x 72 – 85 (78). Útero sinuoso ocupando toda a região posterior do corpo. Ovos medindo 12 – 17 (15) x 7 – 12 (10) [n=50].

Comentários

Semelhante à espécie anterior, para a classificação taxonômica é necessária a análise de um número maior de exemplares. A morfometria dos exemplares estudados não está de acordo com as espécies conhecidas até o presente e estudos complementares são necessários para determinar se trata-se de uma espécie ainda não descrita.

5.3 Análises moleculares

5.3.1 Dosagem

As concentrações de DNA obtidas após o procedimento de extração estão demonstradas na Tabela 3.

Tabela 3. Concentrações de DNA (ng/ μ L) das amostras de didimozoídeos parasitos de *Thunnus obesus* obtidas após procedimento de extração.

Amostras (ID)	Concentração de DNA sem tratamento (ng/ μ l)	Concentração de DNA com tratamento (ng/ μ l)
DI01	5	-
DI02	35	-
DI03	56	-
DI04	20	-
DI05	55	-
DI06	0,147	-
DI07	54	-
DI08	13,1	298,07
DI09	-7,68	-
DI10	2,8	335,24
DI11	3,1	313,18
DI12	8,0	326,88
DI13	3,2	312,02
DI14	1,6	315,04
DI15	4,6	340,72

5.3.2 Amplificação do DNA

A amostra DI09 não foi submetida a reação em cadeia de polimerase em função da ausência de material genético segundo o resultado obtido na dosagem do DNA extraído.

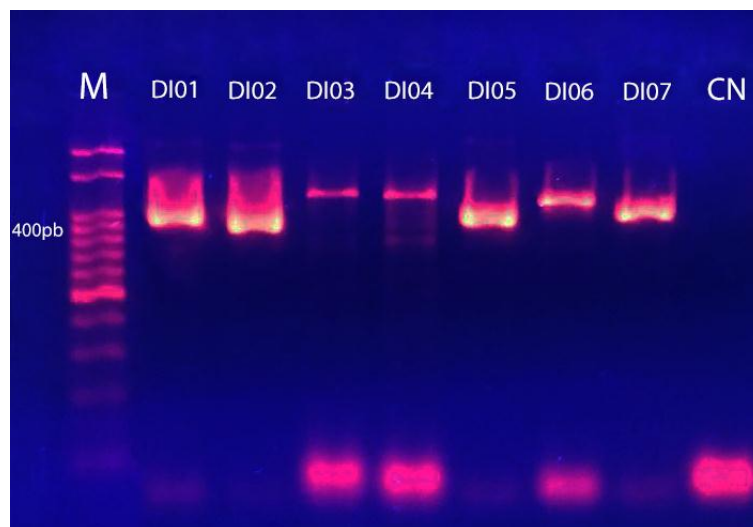


Figura 10: Resultado da eletroforese dos produtos da PCR. Amostras DI01, DI02, DI03, DI04, DI05, DI06 e DI07. Marcador 50pb (Ludwig Biotec).



Figura 11: Resultado da eletroforese dos produtos da PCR. Amostras DI08, DI10, DI11, DI12, DI13, DI14 e DI15. Marcador 100pb (Ludwig Biotec).

Tabela 4: Número de sequências obtidas referente a cada espécie de didimozoídeo parasito de *Thunnus obesus* após o sequenciamento nucleotídico das amostras.

Espécies	Nº de sequências obtidas	ID
<i>Didymocystis neothunni</i>	1	DI07
<i>Didymosulcus philobranchiarca</i>	2	DI05; DI15
<i>Koellikerioides internogastricus</i>	4	DI01; DI02; DI06; DI08
<i>Platocystis vivipara</i>	2	DI10; DI12
Didymozoidae gen. sp. 1	1	DI13

5.3.3 Análise genética

A matriz intraespecífica exibe uma estimativa de divergência evolutiva média sobre pares de sequências dentro de grupos, onde o número de diferenças de base por sítio a partir da média de todos os pares de sequência dentro de cada grupo, é mostrado. Na matriz interespecífica é demonstrada uma estimativa de divergência evolutiva sobre pares de sequências entre grupos, onde podemos observar o número de diferenças de base por sítio a partir da média de todos os pares de sequências.

5.3.3.1 *Didymocystis neothunni*

A sequência obtida de *D. neothunni* apresentou cobertura de 163 pares de base e 98% de identidade com *Didymocystis semiglobularis* (FJ628673) que foi empregada como sequência de referência. No alinhamento (Fig.11) foram observados três polimorfismos de nucleotídeo único: T72A; C125T; G159T; entre *D. neothunni* e *D. semiglobularis*. A nome da espécie *Didymocystis bifasciatus* referente as sequências de número de acesso FJ628698, FJ628699, FJ628600 e FJ62801 foi corrigido nos alinhamentos para *Didymocystis alalongae*, pois de acordo com Murugesh & Madhavi (1995) a espécie *Didymocystis bifasciatus* é considerada sinônimo de *Didymocystis alalongae*.

Para a elaboração das matrizes intra e interespecífica foram utilizadas 14 sequências sendo 13 de parasitos pertencentes ao gênero *Didymocystis* disponíveis no GenBank e uma de *D. neothunni*.

Houve um total de 163 posições analisadas no conjunto de dados final. A matriz intraespecífica (Tabela 5) exibiu a presença de n/c nos resultados, que denota casos em que não foi possível estimar as distâncias evolutivas. Neste caso, ocorre diante da existência de apenas uma sequência de *D. neothunni*. Também são observados os valores de distância genética dos polimorfismos intraespecíficos que constam no alinhamento, expressados onde o resultado é >0.

Na Tabela 6 são apresentadas as distâncias interespecíficas que revelam que dentre as espécies analisadas, *D. semiglobularis* possui a maior proximidade genética com *D. neothunni*, exibindo o valor de 0.018 de distância.

Tabela 5: Matriz de distância genética intraespecífica de *Didymocystis neothunni*.

Espécies	Distâncias genéticas
<i>Didymocystis semiglobularis</i>	0
<i>Didymocystis pectoralis</i>	0
<i>Didymocystis lingualis</i>	0
<i>Didymocystis alalongae</i>	0,003
<i>Didymocystis neothunni</i>	n/c

Tabela 6: Matriz de distância genética interespecífica de *Didymocystis neothunni*.

Espécies	<i>D. alalongae</i>	<i>D. pectoralis</i>	<i>D. lingualis</i>	<i>D. semiglobularis</i>
<i>D. alalongae</i>				
<i>D. pectoralis</i>	0,020			
<i>D. lingualis</i>	0,038	0,037		
<i>D. semiglobularis</i>	0,002	0,018	0,037	
<i>D. neothunni</i>	0,020	0,037	0,055	0,018

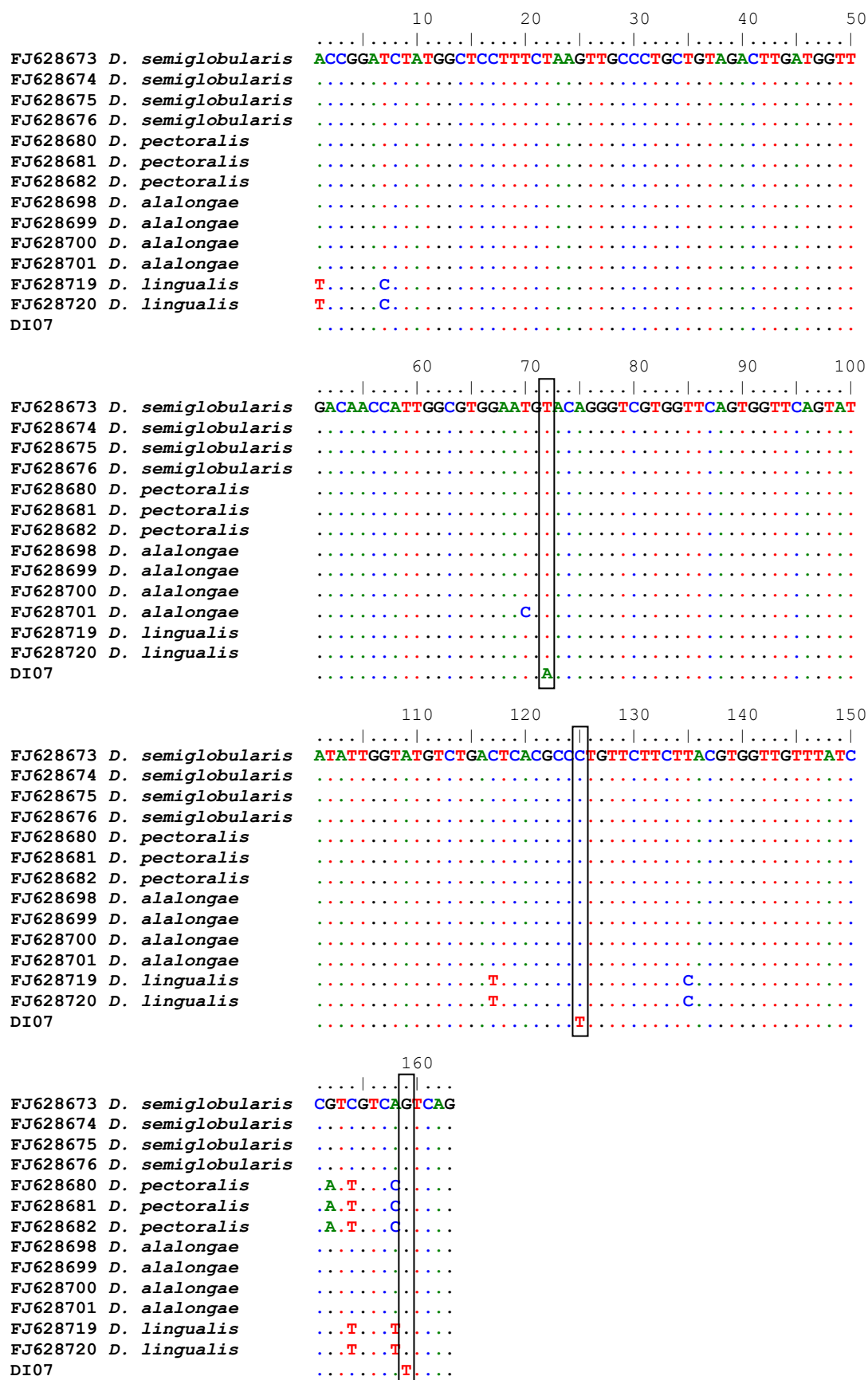


Figura 12: Alinhamento de seqüências de ITS2 de *Didymocystis neothunni*. Em detalhe polimorfismos utilizando *D. semiglobularis* (FJ628673) como seqüência de referência.

5.3.3.2 *Didymosulcus philobranthiarca*

As sequências obtidas de *D. philobranthiarca* neste estudo demonstraram-se idênticas. *D. philobranthiarca* apresentou 188 pb de cobertura e 98% de identidade com *Didymosulcus wedli* (= *Didymocystis wedli*) (AB725625) que foi empregada como sequência de referência. No alinhamento (Fig.12) foram observados onze polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs): C7T; T56del; C53T; A54G; T91in; T117C; T125C; T146C; G152A; T158A; G159A entre *D. philobranthiarca* e *D. wedli*, sendo T56del e T91in possíveis assinaturas específicas.

Para a elaboração das matrizes intra e interespecífica foram utilizadas 28 sequências (Anexo 1) sendo 26 de parasitos pertencentes a gêneros *Didymosulcus*, disponíveis no GenBank e duas de *D. philobranthiarca*.

Houve um total de 164 posições analisadas no conjunto de dados final. Na matriz intraespecífica (Tabela 7) são observados os valores de distância genética dos polimorfismos intraespecíficos que constam no alinhamento, expressados onde o resultado é >0.

Na Tabela 8 são apresentadas as distâncias interespecíficas que demonstram que dentre as espécies analisadas, *D. wedli*, *D. palati* e *D. irregularis* possuem a mesma distância genética com *D. philobranthiarca* de 0.056.

Tabela 7: Matriz de distância genética intraespecífica de *Didymosulcus philobranthiarca*.

Espécies	Distâncias genéticas
<i>Didymosulcus wedli</i>	0
<i>Didymosulcus irregularis</i>	0
<i>Didymosulcus palati</i>	0,001
<i>Didymosulcus spirocauda</i>	0,004
<i>Didymosulcus philobranthiarca</i>	0

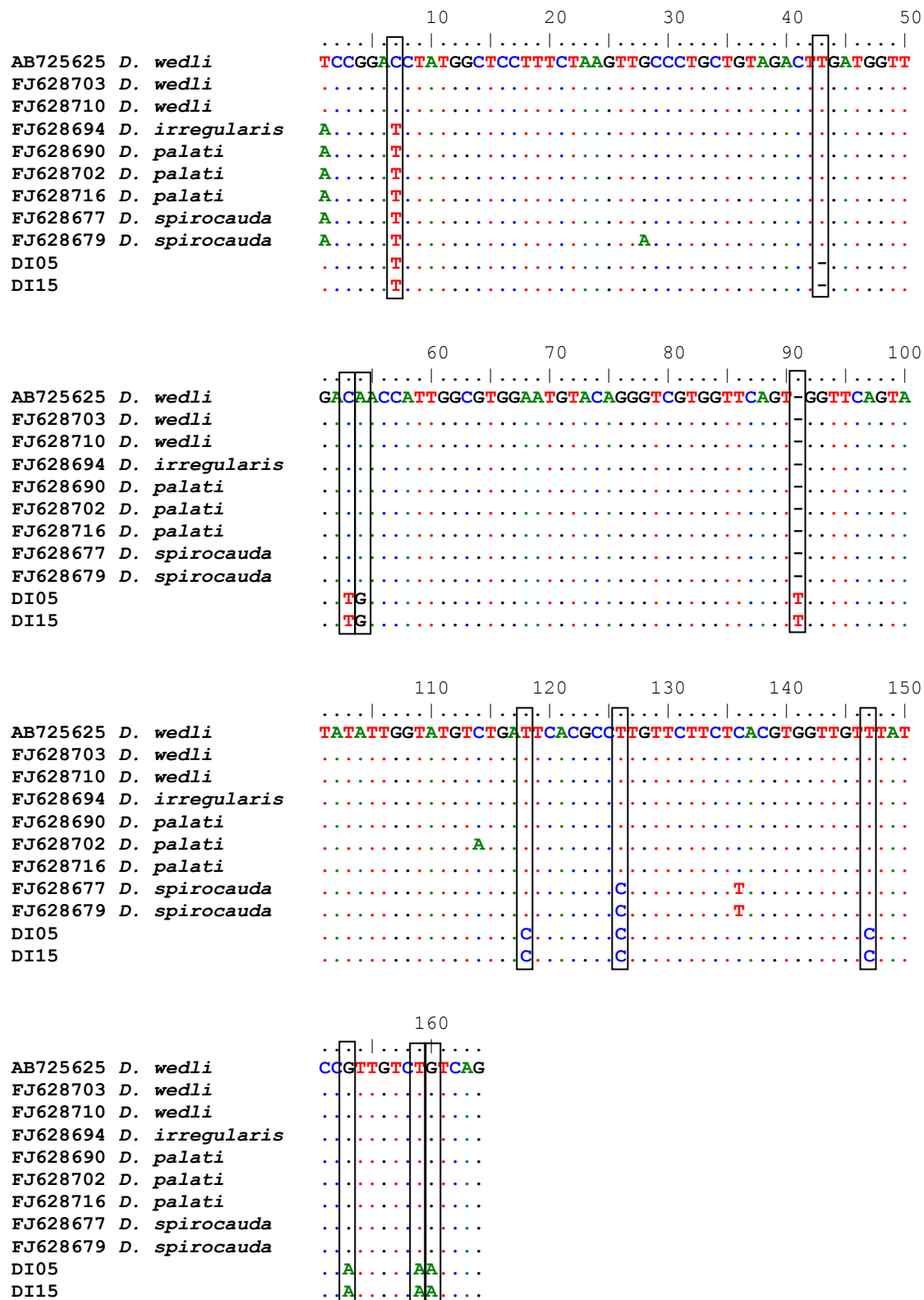


Figura 13: Alinhamento de sequências de ITS2 de *Didymosulcus philobranchiarca*. Em detalhe polimorfismos utilizando *Didymosulcus wedli* (AB725625) como sequência de referência.

Tabela 8: Matriz de distância genética interespecífica de *Didymosulcus philobranchiarca*.

Espécies	<i>D. wedli</i>	<i>D. irregularis</i>	<i>D. palati</i>	<i>D. spirocauda</i>
<i>Didymosulcus wedli</i>				
<i>Didymosulcus irregularis</i>	0,012			
<i>Didymosulcus palati</i>	0,013	0,001		
<i>Didymosulcus spirocauda</i>	0,027	0,014	0,015	
<i>Didymosulcus philobranchiarca</i>	0,056	0,056	0,056	0,058

5.3.3.3 *Koellikerioides internogastricus*

As sequências obtidas de *K. internogastricus* em neste estudo demonstraram-se idênticas. *K. internogastricus* apresentou cobertura de 163 pares de base e identidade de 99% com *K. apicalis* (AB725622) que foi empregada como sequência de referência. No alinhamento (Fig.13) foi observado apenas o polimorfismo de nucleotídeo único G144A entre *K. internogastricus* e *K. apicalis*.

Para a elaboração das matrizes intra e interespecífica foram utilizadas 14 sequências sendo 10 de parasitos pertencentes aos gêneros *Koellikerioides* e *Koellikeria* disponíveis no GenBank e quatro de *K. internogastricus*.

Houve um total de 163 posições analisadas no conjunto de dados final. Na matriz intraespecífica (Tabela 9) são observados os valores de distância genética dos polimorfismos intraespecíficos que constam no alinhamento, expressados onde o resultado é >0.

Na Tabela 10 são apresentadas as distâncias interespecíficas que revelam que dentre as espécies analisadas, *Koellikeria* sp. '*renalis*' possui a maior proximidade genética com *K. internogastricus*, exibindo o valor de 0.003 de distância.

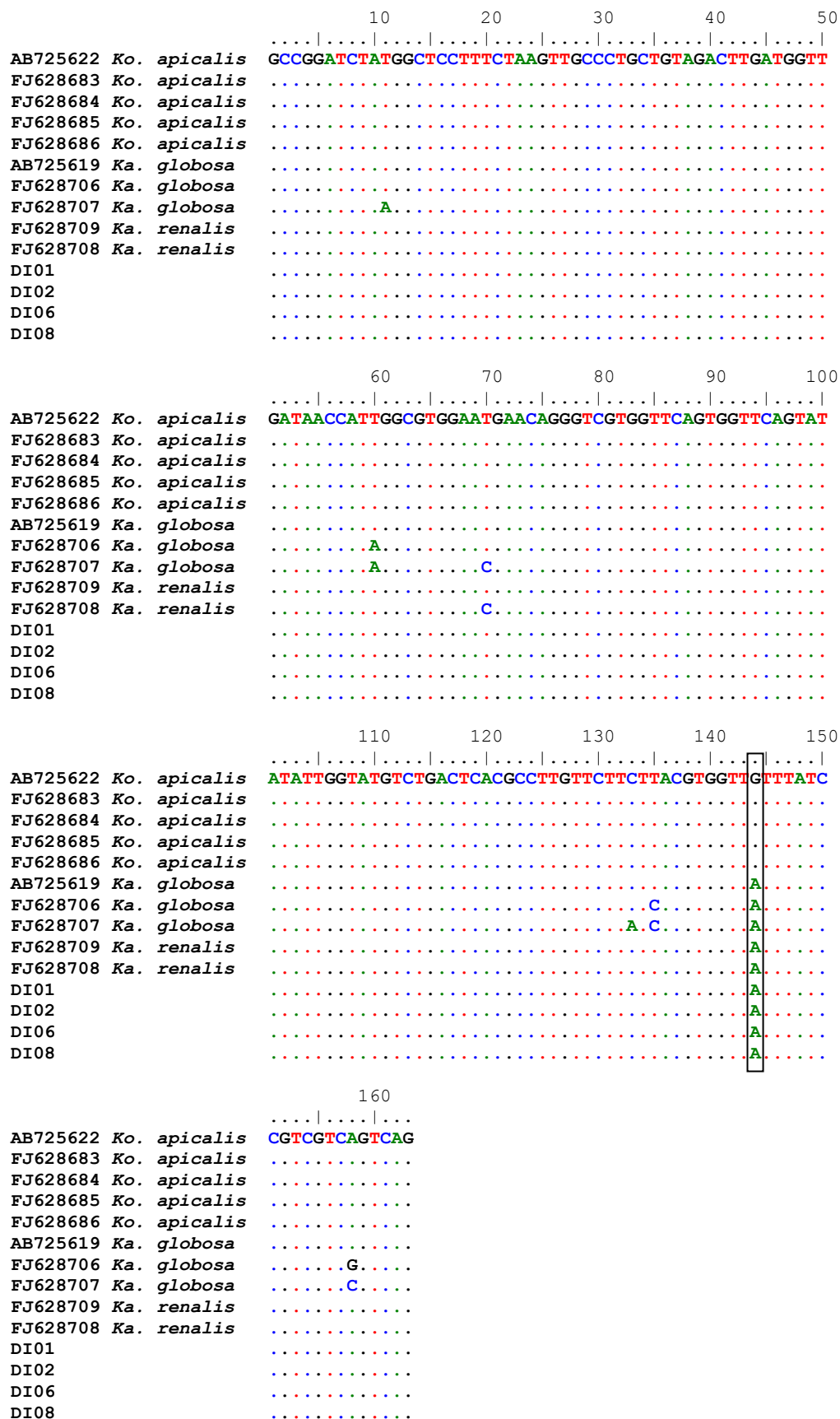


Figura 14: Alinhamento de seqüências de ITS2 de *Koellikerioides internogastricus*. Em detalhe polimorfismo utilizando *Koellikerioides apicalis* (AB725622) como seqüência de referência.

Tabela 9: Matriz de distância genética intraespecífica de *Koellikerioides internogastricus*.

Espécies	Distâncias genéticas
<i>Koellikerioides apicalis</i>	0
<i>Koellikeria globosa</i>	0,027
<i>Koellikeria</i> sp. 'renalis'	0,006
<i>Koellikerioides internogastricus</i>	0

Tabela 10: Matriz de distância genética interespecífica de *Koellikerioides internogastricus*.

Espécies	<i>Koellikerioides apicalis</i>	<i>Koellikeria globosa</i>	<i>Koellikeria</i> sp. 'renalis'
<i>Koellikerioides apicalis</i>			
<i>Koellikeria globosa</i>	0,025		
<i>Koellikeria</i> sp. 'renalis'	0,009	0,019	
<i>Koellikerioides internogastricus</i>	0,006	0,018	0,003

5.3.3.4 *Platocystis vivipara*

As sequências obtidas de *Platocystis vivipara* neste estudo demonstraram-se idênticas. *P. vivipara* apresentou 163 pb de cobertura e 98% de identidade com *P. alalongae* (FJ628687) que foi empregada como sequência de referência. No alinhamento (Fig.14) foram observados três polimorfismos de nucleotídeo único: G107T; C123T; C135T entre *P. vivipara* e *P. alalongae*.

Para a elaboração das matrizes intra e interespecífica foram utilizadas 5 sequências sendo 3 de parasitos pertencentes ao gênero *Platocystis* disponíveis no GenBank e duas de *P. vivipara*.

Houve um total de 163 posições analisadas no conjunto de dados final. Na matriz intraespecífica (Tabela 11) não há polimorfismos intraespecíficos, assim como é observado no alinhamento das sequências do gênero.

Na Tabela 12 é apresentada a distância interespecífica entre *P. vivipara* e *P. alalongae* de 0.018.

Tabela 11: Matriz de distância genética intraespecífica *Platocystis vivipara*.

Espécies	Distâncias genéticas
<i>Platocystis alalongae</i>	0
<i>Platocystis vivipara</i>	0

Tabela 12: Matriz de distância genética interespecífica *Platocystis vivipara*.

Espécies	<i>Platocystis alalongae</i>
<i>Platocystis alalongae</i>	
<i>Platocystis vivipara</i>	0,018

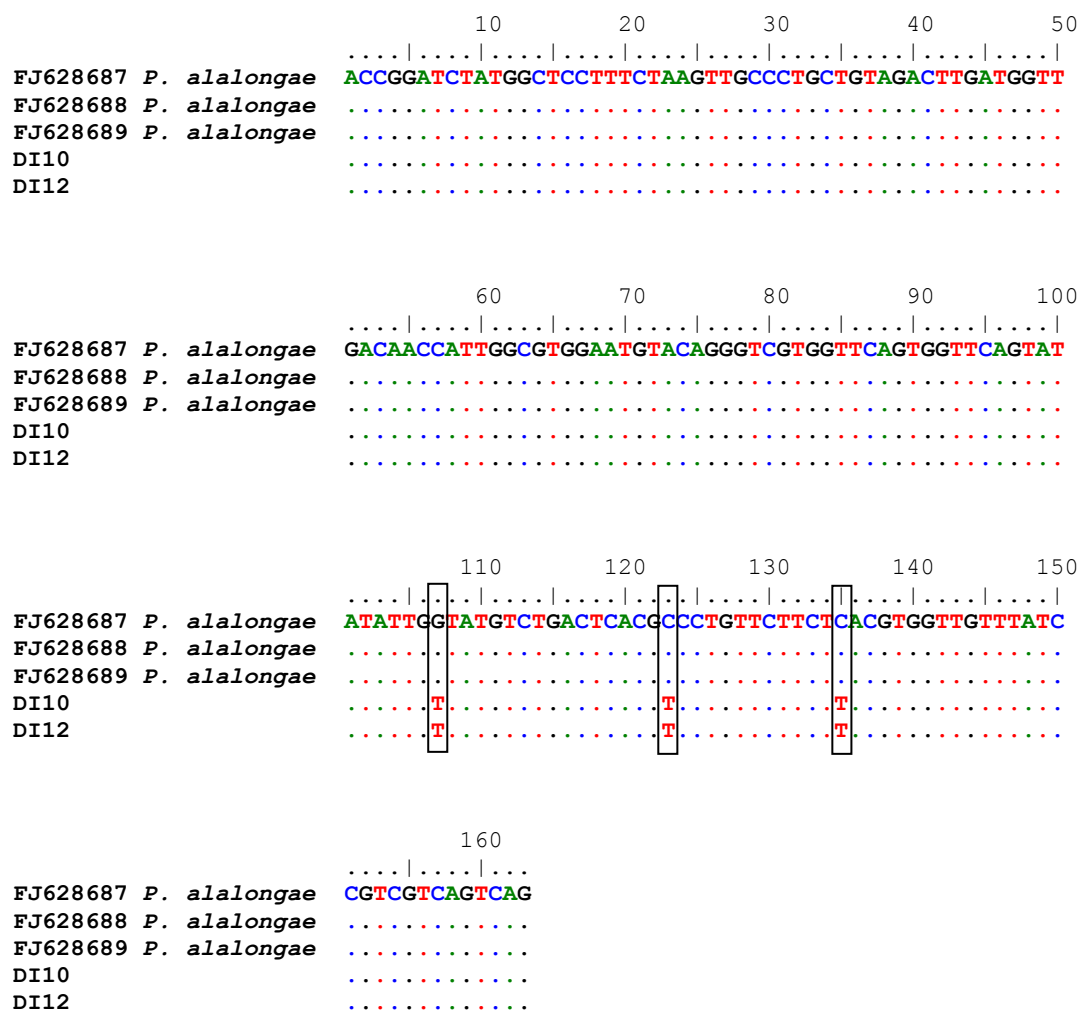


Figura 15: Alinhamento de seqüências de ITS2 de *Platocystis vivipara*. Em detalhe polimorfismos utilizando *Platocystis alalongae* (FJ628687) como seqüência de referência.

5.3.3.5 Didymozoidae gen. sp. 1

A sequência obtida de Didymozoidae gen. sp. 1 apresentou cobertura de 163 pares de base e 98% de identidade com *Didymocystis semiglobularis* (FJ628673) que foi empregada como sequência de referência. No alinhamento (Fig.15) foram observados quatro polimorfismos de nucleotídeo único: C57T; G152A; C154T; A158T entre Didymozoidae gen. sp. 1 e *D. semiglobularis*. Para a elaboração das matrizes intra e interespecífica foram utilizadas 53 sequências (Anexo 2) sendo 52 de parasitos pertencentes aos gêneros *Didymocystis*, *Didymosulcus*, *Platocystis*, *Koellikerioides* e *Koellikeria* disponíveis no GenBank e uma de Didymozoidae gen. sp. 1.

Houve um total de 163 posições analisadas no conjunto de dados final. A matriz intraespecífica (Tabela 13) exibiu a presença de n/c nos resultados, que denota casos em que não foi possível estimar as distâncias evolutivas e assim como na análise de *D. neothunni*, também ocorre diante da existência de apenas uma sequência de Didymozoidae gen. sp. 1 neste estudo. Também são observados os valores de distância genética dos polimorfismos intraespecíficos que constam no alinhamento, expressados onde o resultado é >0.

Na Tabela 14 são apresentadas as distâncias interespecíficas que revelam que dentre as espécies analisadas, Didymozoidae gen. sp. 1 apresentou maior proximidade genética com *Didymocystis pectoralis*, exibindo o valor de 0.012 de distância.

A Tabela 15 exhibe uma matriz de distância genética intergênero que revelou que Didymozodae gen. sp. 1 possui a menor distância genética com o gênero *Didymocystis* de 0.024, seguido de *Platocystis* com uma distância de 0.031

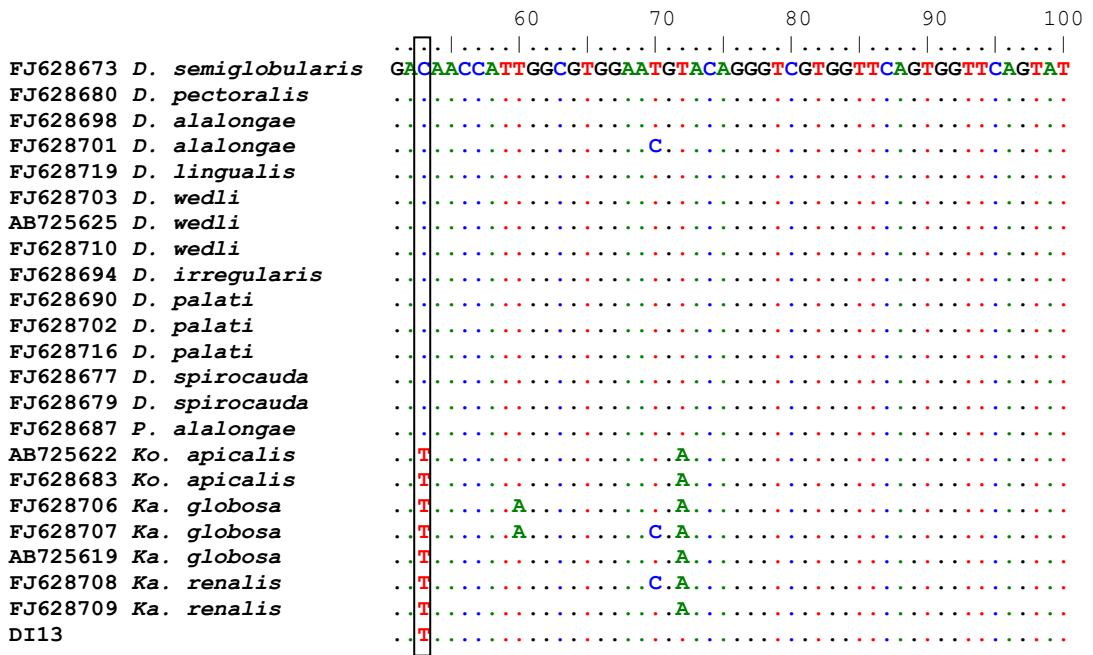
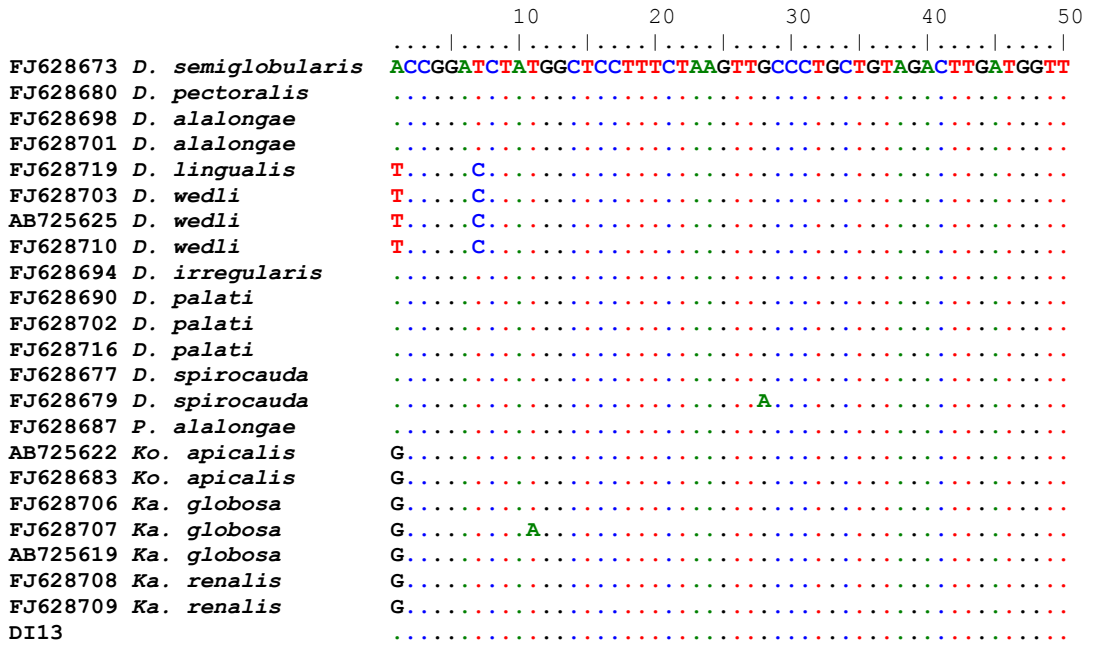
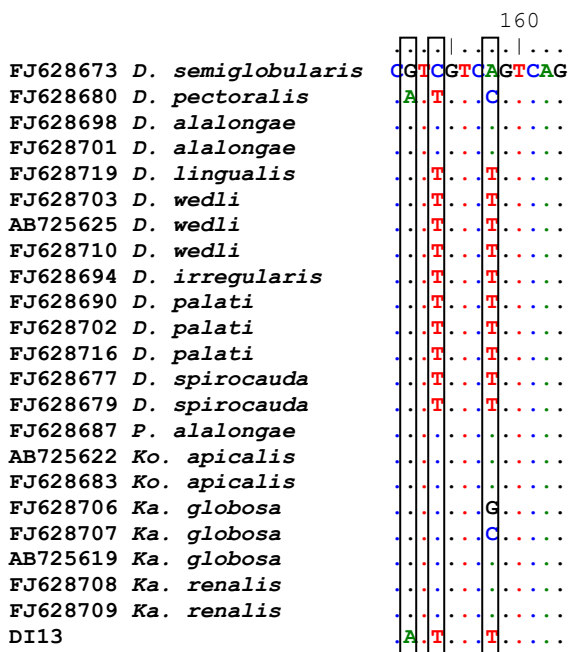
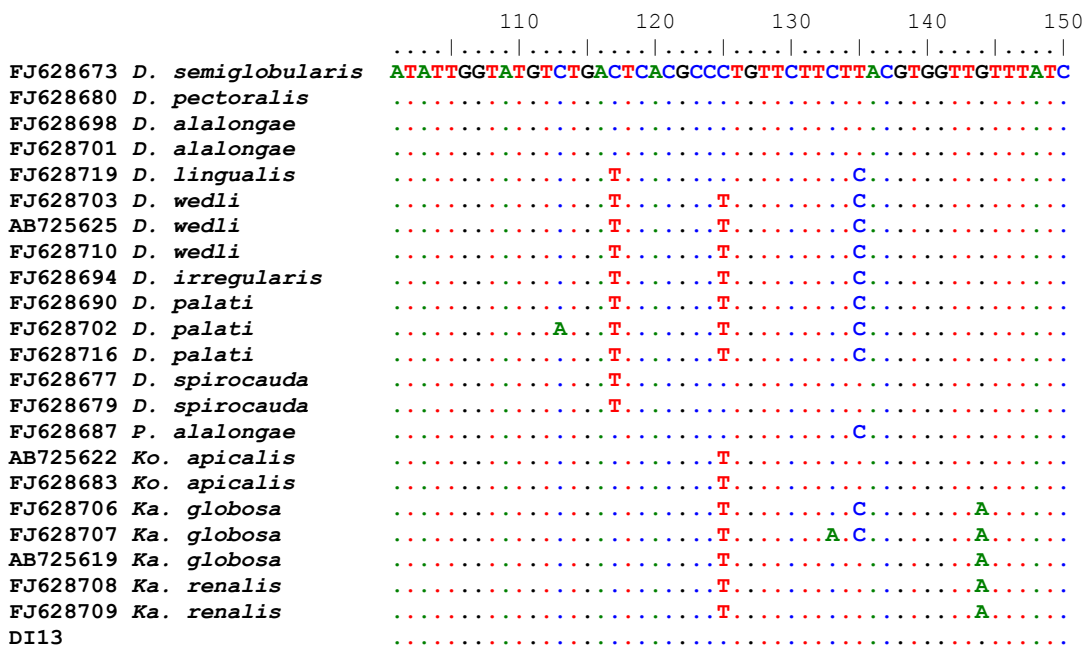


Figura 16: Alinhamento de seqüências de ITS2 de Didymozoidae gen. sp. 1. Em detalhe polimorfismos utilizando *Didymocystis semiglobularis* (FJ628673) como seqüência de referência.



Continuação Figura 16: Alinhamento de seqüências de ITS2 de Didymozoidae gen. sp. 1. Em detalhe polimorfismos utilizando *Didymocystis semiglobularis* (FJ628673) como seqüência de referência.

Tabela 13: Matriz de distância genética intraespecífica Didymozoidae gen. sp. 1.

Espécie	Distância
<i>Didymocystis semiglobularis</i>	0
<i>Didymocystis pectoralis</i>	0
<i>Didymocystis alalongae</i>	0,003
<i>Didymocystis lingualis</i>	0
<i>Didymosulcus wedli</i>	0
<i>Didymosulcus irregularis</i>	0
<i>Didymosulcus palati</i>	0,001
<i>Didymosulcus spirocauda</i>	0,004
<i>Platocystis alalongae</i>	0
<i>Koellikerioides apicalis</i>	0
<i>Koellikeria globosa</i>	0,027
<i>Koellikeria renalis</i>	0,006
Didymozoidae gen. sp. 1	n/c

Tabela 14: Matriz de distância genética interespecífica Didymozoidae gen. sp. 1.

Espécies	<i>D. semiglobularis</i>	<i>D. wedli</i>	<i>D. irregularis</i>	<i>D. palati</i>	<i>D. spirocauda</i>	<i>D. pectoralis</i>	<i>D. lingualis</i>	<i>D. bifasciatus</i>	<i>P. alalongae</i>	<i>K. apicalis</i>	<i>K. globosa</i>	<i>K. renalis</i>
<i>Didymocystis semiglobularis</i>												
<i>Didymosulcus wedli</i>	0,043											
<i>Didymosulcus irregularis</i>	0,031	0,012										
<i>Didymosulcus palati</i>	0,031	0,013	0,001									
<i>Didymosulcus spirocauda</i>	0,020	0,027	0,014	0,015								
<i>Didymocystis pectoralis</i>	0,018	0,043	0,031	0,031	0,020							
<i>Didymocystis lingualis</i>	0,037	0,006	0,018	0,019	0,020	0,037						
<i>Didymocystis alalongae</i>	0,002	0,044	0,032	0,033	0,022	0,020	0,038					
<i>Platocystis alalongae</i>	0,006	0,037	0,025	0,025	0,027	0,025	0,031	0,008				
<i>Koellikerioides apicalis</i>	0,025	0,049	0,043	0,044	0,045	0,043	0,055	0,026	0,031			
<i>Koellikeria globosa</i>	0,049	0,061	0,055	0,056	0,065	0,061	0,067	0,050	0,047	0,025		
<i>Koellikeria sp. 'renalis'</i>	0,034	0,058	0,052	0,053	0,054	0,052	0,064	0,034	0,040	0,009	0,019	
Didymozoidae gen. sp. 1	0,025	0,043	0,031	0,031	0,020	0,012	0,037	0,026	0,031	0,037	0,057	0,046

Tabela 15: Matriz de distância genética intergênero de Didymozoidae gen. sp. 1.

Gêneros	<i>Didymocystis</i>	<i>Didymosulcus</i>	<i>Platocystis</i>	<i>Koellikerioides</i>	<i>Koellikeria</i>
<i>Didymocystis</i>					
<i>Didymosulcus</i>	0,032				
<i>Platocystis</i>	0,015	0,030			
<i>Koellikerioides</i>	0,034	0,046	0,031		
<i>Koellikeria</i>	0,050	0,057	0,044	0,018	
Didymozoidae gen. sp. 1	0,024	0,034	0,031	0,037	0,053

6 DISCUSSÃO

6.1 Sistemática e distribuição geográfica

Os trematódeos pertencentes à família Didymozoidae Monticelli, 1888, representam um grupo de parasitos que usualmente vivem encistados aos pares nos tecidos de teleósteos marinhos, principalmente Scombridae, sendo raramente encontrados parasitando peixes de água doce. No presente estudo, *Thunnus obesus* apresentou-se parasitado por 8 espécies de Didymozoidae, *D. lamotheargumedei*, *D. neothunni*, *D. philobranchiarca*, *K. intestinalis*, *K. internogastricus*, *P. vivípara*, Didymozoidae gen. sp. 1 e Didymozoidae gen. sp. 2.

De acordo com Nikolaeva (1985), a fauna de Didymozoidae no Oceano Pacífico é abundante e variada, com 84 das 143 espécies registradas nas ilhas do Havai, sendo a maioria das espécies descritas e/ou registradas concentradas nessa região, principalmente pelos trabalhos realizados por Yamaguti (1958, 1965, 1970, 1971). Desse total, 47 foram registradas nos mares do Japão, com poucos registros em comum com as espécies do Havai. Posteriormente, outros trabalhos foram realizados e didimozoídeos foram registrados em diferentes localidades. A família Didymozoidae apresentam ampla distribuição geográfica, estando presentes em escombrídeos do Brasil, Baía de Bengala, Havai, Japão, Índia, Mar Adriático e Mar Mediterrâneo. Essa distribuição, provavelmente, está associada ao hábito desses hospedeiros de formarem grandes cardumes com capacidade altamente migratória, podendo, inclusive, realizar migrações interoceânicas

Até o início dos anos 2000, estudos sobre Didymozoidae na América do Sul eram escassos, restritos a 12 espécies: *Paralichthytrema patagonicum* parasitando *Paralichthys patagonicus* Jordan, 1889 na Argentina por Szidat (1960); *Unitubulotestis sardae* no Brasil, de *Sarda sarda* (Bloch, 1793) por Hsu (1968); *Brasicystis bennetti* no Brasil e Peru, parasitando *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) por Thatcher (1979); *Nematobothrium scombri* (Taschenberg, 1879), no Brasil por Rego e Santos (1983) e Alves et al. (2003) e no Peru por Tantaleán e Huiza (1994) parasitando *Scomber japonicus*; *Didymocystis kamegaili* (= *Coelioididymocystis*) parasitando *Katsuwonus pelamis* no Peru por Oliva (1984); *Didymosulcus wedli* (= *Didymocystis wedli*) parasitando *T. albacares* por Kohn et al.

(2001) no Brasil; *Annulocystis auxis* Yamaguti, 1970 e *Coloncyntotrema auxis* Yamaguti, 1951 de *Auxis thazard* por Mogrovejo (2001); *Didymocystis scomberomori* (MacCallum, 1916) Pozdnyakov, 1990, parasitando *Scomberomorus brasiliensis* Collette, Russo & Zavala-Camin, 1978 e *Didymozoum* sp. em *Katsuwonus pelamis*; *Lobatozoum multisacculatum* em *Euthynnus alletteratus* e *Katsuwonus pelamis*; *Didymocystis* sp. em *Euthynnus alletteratus* e *Nematobothrium pelamydis* (Taschenberg, 1879) Ishii, 1935 em *Sarda sarda* por Alves e Luque (2006). Provavelmente os fatores que contribuem para o baixo número de registro dessas espécies no Brasil estão ligados aos habitats peculiares de determinadas espécies, que passam despercebidos ao pesquisador e pelo alto valor de mercado dos escombrídeos de maior porte, que muitas vezes inviabiliza a pesquisa (Justo, 2008)

No entanto, a partir de 2005, diversos registros de trematódeos pertencentes a família Didymozoidae em atuns e afins no Brasil foram realizados em uma série de trabalhos, ampliando bastante o conhecimento da biodiversidade desse grupo no país (Felizardo et al., 2011, Justo e Kohn, 2005, 2008, 2009, 2010, 2012a, b, 2015, Justo et al., 2008, 2009, 2013, Kohn e Justo, 2008).

Nikolaeva (1985) registrou no Oceano Índico, 37 espécies diferentes de didimozoídeos em *T. albacares*, 33 em *K. pelamis*, 25 em *T. obesus*, 19 em *T. thynnis*, 16 em *T. alalunga*, 14 em *Euthynnus affinis*, 11 em *Scomber japonicus* e 9 em *Auxis thazard*.

Os Didymozoidae parasitos de peixes de água doce são raros. A primeira espécie parasita de peixe de água doce no Brasil foi descrita em 1979 por Thatcher, *Brasicystis bennetti*. Até a publicação do autor, somente 2 espécies (em 2 gêneros) eram citadas parasitando peixes de água doce no mundo. Estas duas espécies foram encontradas no Japão e Texas (EUA), respectivamente. *B. benetti* foi considerada como *incertae sedis* na revisão de Pozdnyakov (1996) baseado na descrição original. Subsequentemente, Pozdnyakov & Gibson (2008) na atualização taxonômica da família, consideraram *Brasicystis* Thatcher, 1979 como *genus inquirendum*.

Levantamentos recentes demonstraram que no Brasil, dentre as espécies de peixes, *Micropogonias furnieri* apresenta o maior número de registros de espécies de Trematoda (16), seguido de *T. atlanticus* e *T. obesus* com 15 cada e *K. pelamis* e *T. albacares* com 14. Didymozoidae é a família com maior número de espécies descritas/registradas no Brasil (29) (Cohen et al., 2018). A maioria das espécies de

Didymozoidae descritas ou referidas no Brasil foi encontrada em três espécies hospedeiras, estando restritas aos tuníneos, o que vem a corroborar a informação de que Dizymozoidae é a família mais registrada parasitando mais de uma espécie de peixe, filogeneticamente próximas, nas quais os tunídeos apresentam um alto número de registros. De acordo com Mladineo et al. (2010), a presença em diversas espécies de *Thunnus* proporciona a oportunidade para dispersão da sua fauna parasitária em uma ampla área geográfica. Isso é ainda mais reforçado pela distribuição similar ou sobreposta de hospedeiros intermediários de didimozoídeos parasitos de *Thunnus* spp.

O encontro de duas espécies não identificadas, que requerem mais estudos morfológicos demonstra a diversidade e riqueza da fauna de didimozoídeos em tais hospedeiros, que podem constituir a proposição de novas espécies para a ciência, bem como o registro de uma espécie já conhecida, pela primeira vez na América do Sul.

A presença de altas infecções de didimozoídeos na musculatura causa deterioração mais rápida do pescado, trazendo prejuízos econômicos. Grandes infecções causadas por esses parasitos em escombrídeos da Austrália têm feito com que estes peixes (cerca de 1/3) sejam rejeitados para consumo (Williams Jr; Bunkley-Williams, 1996). A espécie *Platocystis vivipara* que neste estudo foi encontrada parasitando a superfície do corpo do hospedeiro e que pode facilmente ser observada macroscopicamente, pode levar ao descarte do pescado por conta de sua aparência desagradável, assim como Didymozoidae gen. sp 2 que foi observado nas brânquias.

6.2 Potencial zoonótico

De uma forma geral, os didimozoídeos não causam muitos danos aos seus hospedeiros. Porém, quando presentes nas brânquias, podem causar alterações patológicas como distorção na forma do filamento, hiperplasia do epitélio interlamelar e aumento no número das células mucosas, ficando restrito somente à área afetada (Justo & Kohn, 2014). Justo et al. (2009) concluíram que *Koelikerioides internogastricus* é altamente patogênico aos seus hospedeiros, destruindo as

camadas do estômago provocando intensa reação inflamatória, que interfere na digestão dos alimentos, podendo levar o hospedeiro à morte.

O potencial zoonótico de algumas espécies de parasitos é um fator de preocupação para a saúde pública. As doenças causadas pela ingestão acidental de didimozoídeos ainda são muito pouco estudadas, porém Kamegai (1971) já alertava para a presença desses parasitos na musculatura de peixes e ponderou que ovos de didimozoídeos encontrados em fezes humanas no Japão estariam associados ao consumo de peixe indevidamente cozido. No entanto, Traub et al. (2009) identificaram ovos de didimozoídeos em 13% das amostras de fezes humanas na Tailândia e ponderaram que presumivelmente esses ovos foram eliminados mecanicamente pelas fezes, após o consumo de peixe contaminado. Cavalcanti et al. (2012) registraram a ocorrência de *Didymocystis* sp. em *Scomberomorus brasiliensis* provenientes da costa do estado no Rio Grande do Norte no Brasil, entre outros Digenea e afirmam que a ocorrência dessas espécies representa potencial risco para a saúde pública. Estádios larvares de Didymozoidae foram identificados por Nikolaeva (1985), que postulou que essas larvas poderiam aclimatar-se ao intestino humano e realizar migrações peculiares. Essa hipótese não foi devidamente estudada através da realização de experimentos com hospedeiros compatíveis até o momento para que se possa afirmar tal possibilidade, sendo necessário o desenvolvimento de experimentos para elucidar o ciclo biológico desse grupo de parasitos.

6.3 Análises moleculares

De acordo com Pozdnyakov & Gibson (2008), Didymozoidae é um dos grupos mais difíceis, possivelmente o mais difícil, de Digenea para estudos. A interpretação da morfologia e conseqüentemente a classificação é caótica e problemática. Segundo Mladineo et al (2010), é uma das famílias de Digenea taxonomicamente mais complexa. Dessa forma, estudos moleculares vêm colaborar com as abordagens morfológicas para uma determinação taxonômica confiável.

As sequencias de ITS2 obtidas no presente estudo demonstraram que as espécies *D. neothunni*, *D. philobranchiarca*, *K. internogastricus*, *P. vivipara* e

Didymozoidae gen. sp. 1 parasitos de *T. obesus* do litoral do estado do Rio de Janeiro, reconhecidas por critérios morfológicos são geneticamente distintas.

As distâncias genéticas intraespecíficas exibiram de forma quantitativa os polimorfismos dentro de cada grupo de espécies já observados nos alinhamentos.

Didymocystis neothunni apresentou maior proximidade genética com *Didymocystis semiglobularis*, resultado congruente com as análises morfológicas, visto que as duas espécies apresentam grande similaridade, principalmente na forma do corpo, diferindo na presença ou ausência de faringe e na forma de algumas das estruturas reprodutoras femininas, como receptáculo seminal e glândula vitelínica.

Didymosulcus philobranthiarca exibiu a mesma distância genética para três espécies pertencentes ao gênero *Didymosulcus*, *D. wedli*, *D. irregularis* e *D. palati*. Estas espécies apresentam grande semelhança em sua morfologia e também em habitat, o que corrobora com a análise genética, sendo caracterizadas principalmente pelas suas diferenças no número de ramos de ovário e de glândula vitelínica.

As análises moleculares de *Koellikerioides internogastricus* exibiram pouca variabilidade com as espécies pertencentes aos gêneros *Koellikerioides* e *Koellikeria* trabalhadas no estudo, apresentando apenas um polimorfismo marcante para a espécie. O alvo ITS2 é um marcador molecular semiconservado, logo, a utilização de um marcador mais polimórfico como o gene mitocondrial citocromo oxidase 1 (*cox1*) pode ser uma alternativa para a taxonomia molecular das espécies pertencentes a estes gêneros. Além disso, não foi possível encontrar descrições morfológicas da espécie *Koellikeria* sp. '*renalis*', bem como não há nenhuma informação em bancos de dados de biodiversidade disponíveis.

Platocystis vivipara apresentou três polimorfismos com *Platocystis alalongae*, exibindo uma proximidade genética congruente com as análises morfológicas visto que estas duas espécies de *Platocystis* apresentam morfologia e habitat semelhante, diferindo em tamanho do corpo e forma e tamanho de ovário e glândula vitelínica.

As análises moleculares do espécime de Didymozoidae gen. sp. 1 revelaram uma maior proximidade genética com o gênero *Didymocystis*, seguido do gênero *Platocystis*, bem como características morfológicas compartilhadas com ambos os gêneros. Os estudos moleculares realizados irão auxiliar nos próximos passos na

descrição deste parasito visto que Didymozoidae gen. sp. 1 apresenta um conjunto único de nucleotídeos e demonstra tratar-se de um novo taxon.

Um dos primeiros estudos envolvendo abordagens moleculares em Didymozoidae foi realizado por Anderson & Barker (1993) envolvendo 6 espécies morfológicamente distintas. Cada espécie apresentou um padrão único de restrição para cada enzima. Esses resultados indicaram que as seis espécies diferenciadas pela morfologia, eram geneticamente distintas, confirmado que os critérios morfológicos utilizados para distinguir estas espécies eram confiáveis.

Um importante trabalho contendo análise genética da família Didymozoidae foi o de Anderson & Barker (1998) que forneceu subsídio para complementar a identificação por meio das análises morfológicas e então incluir a família Didymozoidae na superfamília Hemiuroidea. Entretanto estudos genéticos deste grupo são até o momento escassos, principalmente devido a grande complexidade do táxon.

Mladineo et al. (2010) realizaram uma análise filogenética *multilocus* de Didymozoidae ocorrentes no Pacífico (*Thunnus orientalis*) e no Atlântico (*T. thynnus*) utilizando parte do gene 28S (rDNA), ITS-2 e do gene mitocondrial citocromo oxidase 1 (*cox1*). Os dados obtidos sugerem que os didimozoídeos pertencem a uma categoria de parasitos nas quais o habitat é a força maior para construir as relações filogenéticas. Durante sua evolução, os didimozoídeos espalharam-se e passaram a habitar diferentes sítios de infecção, colonizando tanto o exterior como nichos interiores estritos, passando por mudanças evolutivas tanto para o sítio de infecção como para a morfologia da parte posterior do corpo. Os resultados obtidos por estes autores apontam espécies filogeneticamente próximas, com grupamentos de espécies de didimozoídeos com uma parte posterior do corpo em forma de coração ocupando nichos mais internos como *D. wedli*, *D. spirocauda*, *D. lingualis*, *D. palati* e *D. irregularis*, separadas de espécies com formas globular, esférica e sacular habitando superfícies externas como *D. pectoralis*, *P. alalongae*, *D. semiglobularis* e *D. bifasciatus*. Considerando as diferenças biogeográficas, Mladineo et al. (2010) encontraram diferenças intraespecíficas utilizando sequências *cox1* para as espécies estudadas *D. wedli* e *D. palati* das populações do litoral mexicano e Mar Adriático.

Melo et al. (2013) realizaram a primeira análise molecular de uma espécie de didimozoídeo no Brasil, revalidando o gênero *Brasicystis* por meio da observação de

alguns caracteres morfológicos que foram mal interpretados e citam que “embora não tenha sequências disponíveis de ITS2 de espécies de *Didymozoon* no GenBank para comparação com *Brasicystis*, um carácter morfológico como a ventosa ventral é suficiente para diferenciar os dois gêneros, enquanto que a comparação molecular com as espécies de *Indodidymozoon* diferenciam esse gênero de *Brasicystis*, com uma distância genética de 16–20%. Esses estudos corroboram a informação de que estudos integrativos são necessários para elucidar problemas taxonômicos, principalmente em casos onde a taxonomia é confusa, como ocorre na família Didymozoidae.

A pouca informação genética disponível dificulta as análises filogenéticas do grupo, além de serem disponibilizadas sequências curtas de genes parcialmente informativos, ao contrário dos genes mitocondriais que são mais polimórficos. Apesar dos genes ribossomais possuírem poucos polimorfismos, os espaços intergênicos (ITS1 e 2) possuem uma taxa de mutação elevada devido ao fato de não codificarem proteínas.

Este é o primeiro trabalho de taxonomia integrativa de didimozoídeos marinhos do Brasil que disponibiliza informação genética inédita para cinco espécies de didimozoídeos, sendo Didymozoidae gen. sp. 1 e 2 possivelmente novos gêneros da família para a ciência.

7 CONCLUSÕES

- Foram encontradas oito espécies de trematódeos pertencentes a família Didymozoidae e novos dados foram apresentados de hospedeiro e localização geográfica. *Didymocystis lamotheargumedei* é pela primeira vez assinalada em *T. obesus* representando um novo hospedeiro para essa espécie. *D. neothunni* é registrada pela primeira vez em *T. obesus* no Brasil, região do Atlântico Sul Ocidental e a ocorrência de *P. vivipara* é registrada pela primeira vez no Brasil e na América do Sul.
- Do total das espécies encontradas, duas espécies, Didymozoidae gen. sp. 1 e Didymozoidae gen. sp. 2 não foram identificadas a nível genérico através de abordagens morfológicas e podem tratar-se de novos táxons para a ciência.
- Foram disponibilizadas sequências nucleotídicas inéditas para cinco espécies analisadas, *Didymocystis neothunni*, *Didymosulcus philobranthiarca*, *Koellikerioides internogastricus*, *Platocystis vivipara* e Didymozoidae gen. sp. 1.
- A identificação morfológica de trematódeos da família Didymozoidae foi corroborada pela identificação molecular para as espécies *Didymocystis neothunni*, *Didymosulcus philobranthiarca*, *Platocystis vivipara* e Didymozoidae gen. sp. 1.
- O alvo ITS2 não se mostrou um marcador molecular eficiente para a espécie *Koellikerioides internogastricus*, sendo necessária a utilização de um marcador mais polimórfico.
- O espécime de Didymozoidae gen. sp 1 exibiu um conjunto único de nucleotídeos e apresentou maior proximidade genética com os gêneros *Didymocystis* e *Platocystis*, contribuindo com dados taxonômicos para as próximas análises de identificação desta espécie.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os novos registros de hospedeiro e localidade geográfica e a escassez de informação genética nos bancos de dados existentes demonstram a necessidade de ampliação das pesquisas deste grupo de parasitos, visto que *Thunnus obesus* é uma espécie de grande importância econômica e a presença de helmintos perencentes a família Didymozoidae pode causar a desvalorização deste pescado.

Este é o primeiro trabalho de taxonomia integrativa de didimozoídeos marinhos do Brasil que disponibiliza informação genética inédita para cinco espécies.

Abastecer o banco genético para que mais estudos integrativos sejam realizados é fundamental. Estes dados complementarão as análises morfológicas, que são de suma importância, considerando a complexidade deste grupo de parasitos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe N, Okamoto M. Molecular characterization of muscle-parasitizing didymozoid from a chub mackerel, *Scomber japonicus*. Acta Parasitol 2015; 60: 557-562.

Abe N, Okamoto M, Maehara T. Molecular characterization of muscle-parasitizing didymozoids in marine fishes. Acta Parasitol 2014; 59: 354–358.

Altringham JD, Block BA. Why do tuna maintain elevated slow muscle temperatures? Power output of muscle isolated from endothermic and ectothermic fish. J Exp Biol 1997; 200: 2617-2627.

Alves DR, Luque, JL. Ecologia das comunidades parasitárias de cinco espécies de escombrídeos (Perciformes: Scombridae) do litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet 2006; 15: 167-181.

Alves DR, Luque JL, Abdallah VD. Metazoan parasites of chub mackerel, *Scomber japonicus* Houttyn (Osteichthyes: Scombridae) from the coastal zone of the state of Rio de Janeiro, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2003; 12: 164-170.

Anderson GR, Barker SC. Species differentiation in the Didymozoidae (Digenea): restriction fragment length differences in internal transcribed spacer and 5.8S ribosomal DNA. Int J Parasitol 1993; 23: 133-136.

Anderson GR, Barker SC. Inference of phylogeny and taxonomy within the Didymozoidae (Digenea) from the second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA. Syst Parasitol 1998; 41: 87–94.

Barker SC, Blair D, Garrett AR, Cribb TH. Utility of the D1 domain of nuclear 28S rRNA for phylogenetic inference in the Digenea. Syst Parasitol 1993; 26: 181-188.

Braun M. Vermes. Bronn's Kl. u. Ordnung. Thier-Reichs. 4, Abt. La. Lief. 1893; 23-30: 817-925.

Bray RA, Gibson DI, Jones A. Keys to the Trematoda. Vol. 3. CABI Publishing, Wallingford, UK, and The Natural History Museum, London 2008; 824p.

Brill RW. On the standard metabolic rate of tropical tunas, including the effect of body size and acute temperature change. *Fish Bull* 1987; 85: 25-35.

Brill RW. Selective advantages conferred by the high-performance physiology of tunas, billfishes and dolphin fish. *Comp Bioch Physiol* 1996; 113: 3-15.

Carney WP, Nocun R, Vergel AG, Pagaran I, Mercado A, Cross JH. Intestinal parasites of man in Agusan del Norte, Philippines with emphasis on Schistosomiasis and Capillariasis. *Phil J Microbiol Infec Dis* 1987; 16: 5-9.

Cavalcanti ETS, Takemoto RM, Alves LC, Chellappa S. First report of metazoan fish parasites with zoonotic potential in *Scomberomorus brasiliensis* and *Trichiurus lepturus* from the coastal waters of Rio Grande do Norte, Brazil. *Marine Biodiversity Records* 2012; 4: e40.

Chatwin AC. Estimativa da abundância do bonito pintado, *Euthynnus alletteratus*, e do bonito cachorro, *Auxis* spp, (Teleostei: Scombridae) na costa sudeste brasileira. Tese [Doutorado] - Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 1997; 1-113.

Chung PR, Cross JH. Prevalence of intestinal parasites in children in Taiwan off shore Island determined by the use of several diagnostic methods. *J Formos Med Assoc* 1975; 74: 411-418.

Cohen SC, Fernandes BMM, Gibson D, Bray RA, Pinto HA, Campião KM, Justo M. Didymozoidae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. 2018. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/2719>>. Acesso em: 16 Ago. 2018.

Collette BB, Nauen CE. *FAO Species Catalogue. Vol. 2. Scombrids of the World. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos, and related species know to date.* *FAO Fish Synop* 1983; 125-137.

Contreras-Guzmán ES. *Bioquímica de pescados e derivados.* Jaboticabal: FUNEP 1994; 409 p.

Cross JH, Zaraspe G, Alquiza L, Ranoa C. Intestinal parasites in some patients seen at San Lazaro Hospital, Manila, Philippines. *Phil J Microbiol Infec Dis* 1989; 18: 25-27.

Dollfus RP. Sur l'état actuel de la classification des Didymozoonidae Monticelli, 1888 (Didymozoidae Franz Poche, 1907). Ann Parasitol Hum Comp 1926; 4: 148-161.

Eiras JC, Rego AA. The histopathology of *Somber japonicus* infection by *Nematobothium scombri* (Trematoda: Didymozoidae) and larval anisakid nematode infections in the liver of *Pagrus pagrus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82: 155-159.

Eiras JC, Takemoto RM, Pavanelli GC. Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. Eduem 2006.

Fagundes L, Arfelli CA, Amorim AF. Parâmetros de crescimento e de mortalidade da Albacora-Bandolim, *Thunnus Obesus*, capturada no litoral Sudeste-Sul do Brasil (1977-95). Bol Inst Pesca, São Paulo 2001; 27: 175-184.

Felizardo NN, Justo MC, Knoff M, Fonseca MCG, Pinto RM, Gomes DC. Juvenile didymozoids of the types, Torticaecum and Neotorticaecum (Didymozoidae: Digenea), from new marine fish hosts (Pisces: Teleostei) in the neotropical region of Brazil. J Helminthol 2011; 85: 270-275.

Fischer, W. FAO species identification sheets for fishery purposes, western central Atlantic (fishing area 31). (Ed) Rome: Food and Agriculture Organization, Fish Res Environ Div 1978; Vol. IV (looseleaf).

Fonteneau A. Atlas of tropical tuna fisheries: Word catches and environment. ORSTOM Editions. Paris 1997; 192p.

Gibson DI. Trematoda. Guide to the parasites of fishes of Canada. In: Margolis L, Kabata Z (Eds) part IV. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences n. 124. NRC Press, Ottawa, 1996; 373p.

Gibson DI, Bray RA. The Hemiuroidea: terminology, systematics and evolution. Bull Brit Mus (Zool Ser) 1979; 36: 35-146.

Gibson DI, Jones A, Bray RA. Keys to the Trematoda. Vol. 1. CABI Publishing, Wallingford, UK, and The Natural History Museum, London 2002; 521p.

Golemberg EM, Bickel A, Weihs P. Effect of highly fragmented DNA on PCR. Nucleic Acids Res. 1996; 24: 5026-5033.

Guia de Identificação de Atuns do Atlântico. Direcção-Geral das Pescas e Aquicultura. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas; Portugal 2008.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98 p.

Hsu KC. *Unitubulotestis sardae* (Trematoda: Didymozoidae) from Brazil. *J Parasitol* 1968; 54: 128.

ICCAT - International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas. Report of the 2004 ICCAT Bigeye Tuna Stock Assessment Session. Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT 2005; 58:1-110.

ICCAT - International Commission for Conservation of Atlantic Tunas. Report of the Standing Committee on Research and Statistics (SCRS), Madrid, Spain, outubro, 2007.

Ishii N. Studies on the family Didymozoidae Monticelli, 1888. *Jap J Zool* 1935; 48: 279-335.

Jones A, Bray RA, Gibson DI. *Keys to the Trematoda*. Vol. 2. CABI Publishing, Wallingford, UK, and The Natural History Museum, London 2005; 745p.

Justo MCN. Taxonomia e índices parasitários de helmintos Digenea, Monogenea e Cestoda parasitos de atuns e afins (Teleostei, Thunnini) ocorrentes ao largo da costa do estado do Rio de Janeiro. Tese [Doutorado em Zoologia] – Museu Nacional, UFRJ; 2008; p. 1-262.

Justo MCN, Kohn A. Didymozoidae (Digenea) parasites of Scombridae (Actinopterygii) from Rio de Janeiro coast, Brazil. *Rev Brasil Zool* 2005; 7: 333-338.

Justo MCN, Kohn A. Report of *Didymocylindrus filiformis* (Digenea: Didymozoidae) From Scombrids (Actinopterygii) from Rio de Janeiro coast. In: III Congresso de Oceanografia, 2008, Fortaleza. Associação Brasileira de Oceanografia, 2008.

Justo MCN, Kohn A. Trematoda, Digenea, Didymozoidae, *Coeliotrema thynni* Yamaguti, 1938: First record in Brazil with three new host records. Check List 2009; 5: 436-438.

Justo MCN, Kohn A. Trematoda, Digenea, Didymozoidae, *Wedlia retrorbitalis* (Yamaguti, 1970) and *Wedlia submaxillaris* (Yamaguti, 1970): First record in South America and the Atlantic Ocean. Check List 2010; 6: 387-389.

Justo MCN, Kohn A. New data on three species of *Koellikerioides* (Digenea, Didymozoidae) in Brazilian tuna fish. Neot Helminthol 2011; 5:113-123.

Justo MCN, Kohn A. A new genus and species of the Didymozoidae (Digenea) from the skipjack tuna *Katsuwonus pelamis* (L.) (Scombridae). Syst Parasitol 2012a; 81: 195-201.

Justo MCN, Kohn A. Notes on helminth of tuna fishes (Scombridae) in Brazil. Revista Mexicana de Biodiversidad 2012b; 83: 285-290.

Justo MCN, Kohn A. Monogenoidea and Digenea parasites of *Thunnus atlanticus* (Perciformes, Scombridae) from Rio de Janeiro coast, Brazil. Neotrop Helminthol 2014a; 8: 339-348.

Justo MCN, Kohn, A. Patologia e Sanidade em ambientes aquáticos. *Didymozoidae: Um grupo enigmático de parasitos*. Eds. Madi, R. R., Campos, C. M., Lizama, L. A. P, Takemoto, R. M. 1 Ed. Maringá: Massoni. 2014b: 342p.

Justo MCN, Kohn A. *Thunnus obesus* (Perciformes, Scombridae), a new host record for three species of Digenea from the coastal zone of the state of Rio de Janeiro, Brazil. Bioikos 2015; 29: 35-38.

Justo MC, Kohn A, Pereira CS, Flores-Lopes F. Histopathology and autoecology of *Didymocylindrus simplex* (Digenea: Didymozoidae), parasite of *Katsuwonus pelamis* (Scombridae) in the Southwestern Atlantic Ocean, off South America. Zoologia 2013; 30: 312-316.

Justo MCN, Tortelly R, Menezes RC, Kohn A. First record in South America of *Didymosulcus palati* and *Didymosulcus philobranchiarca* (Digenea, Didymozoidae)

with new hosts records and pathological alterations. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2008; 103: 207-210.

Justo MCN, Tortelly R, Menezes RC, Kohn A. First record in South America of *Koellikerioides internogastricus* (Digenea, Didymozoidae) with new host record and pathological alterations. Vet Parasitol 2009; 161: 158-161.

Kamegai S. The determination of a generic name of flying fishes muscle parasite, a didymozoid, whose ova have occasionally been found in human feces in Japan. J Parasitol 1971; 20: 170-176.

Kohn A, Justo MCN. *Didymocystis lamotheargumedei* n. sp. (Digenea: Didymozoidae) a parasite of three species of scombrid fishes. Rev Mex Biod 2008; 79: 9S -14S.

Kohn A, Santos AL, Baptista-Farias MFD. Report of *Didymocystis wedli* Ariola, 1902 (Digenea; Didymozoidae) from *Thunnus albacares* in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96: 951-954.

Kumar S, Stecher G, Koichiro Tamura. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. Molecular Biology and Evolution 2015.

Lester RJG. Description of two new didymozoids from Australian fishes. J Parasitol 1979; 65: 904-908.

Lester RJG. Host-parasite relations in some didymozoid trematodes. J Parasitol 1980; 63: 527-531.

MacCallum GA. Some new forms of parasitic worms. Zootol 1917; 1: 43-75.

Madhavi R, Ram BK. Community structure of helminth parasites of the tuna, *Euthynnus affinis*, from the Visakhapatnam coast, Bay of Bengal. J Helminthol 2000; 74: 337-342.

Mamaev YL. [Helminths of tuna fish in the South China Sea.] In: Skryabin KI, Mamaev Yu L [Helminths of Animals of the Pacific Ocean] Moscow, Nauka 1968: 5-27.

Melo FT, Silva JP, Gonçalves EC, Furtado AP, Giese EG, Santos CP, Santos J N. Taxonomic status and redescription of the genus *Brasicystis* Thatcher, 1979 (Digenea: Didymozoidae). *Parasitol Int* 2013; 62: 208-14.

Miyake M. Field Manual for statistics and sampling Atlantic tunas and tuna-like fishes. 3.ed. Madrid: International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas; 1990. 184 p.

Mladineo I. Histopathology of five species of *Didymocystis* spp. (Digenea: Didymozoidae) in cage-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). *Vet Res Comm* 2006; 30: 475-484.

Mladineo I & Bočina. Type and ultrastructure of *Didymocystis wedli* and *Koellikerioides intestinalis* (Digenea, Didymozoidae) cysts in captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* Linnaeus, 1758). *J Appl Ichthyol* 2009; 25: 762–765.

Mladineo I, Bott NJ, Nowak BF, Block BA. Multilocus phylogenetic analyses reveal that habitat selection drives the speciation of Didymozoidae (Digenea) parasitizing Pacific and Atlantic bluefin tunas. *Parasitology* 2010; 137: 1013-1025.

Mladineo I, Tudor M. Digenea of Adriatic cage-reared northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*). *Bull Eur Ass Fish Pathol* 2004; 24: 144-152.

Mogrovejo CD. *Biologia Parasitária de Auxis thazard* (Lacépède, 1800) (Actinopterygii, Perciformes, Scombridae) comercializado no Rio de Janeiro e aplicação na oceanografia biológica. Dissertação de Mestrado, Universidade Santa Ursula, 2001.

Monticelli FS. Saggio di una morfologia del trematodi. Tesi per ottenere la privata docenza in Zoologia nella R. Università di Napoli. Stabilimento tipografico Fili, Ferrante, Naples 1888; 130 p.

Murugesh M. Monogenetic trematodes from scombrid fishes of the Visakhapatnam coast, Bay of Bengal. *J Nat Hist* 1995; 9: 1-26.

Murugesh M, Madhavi, R. Some new and know species of the genus *Didymocystis* Ariola, 1902 (Trematoda: Didymozoidae) from scombrid fishes of the Visakhapatnam coast, Bay of Bengal. *Syst Parasit* 1995; 31: 11-24.

Nikolaeva VM. To the study of helminthofauna of *Thunnus albacares* and Histiopharidae in the Gulf of Mexico. Invest Cent Am Seas 1968; 2: 150-157 (em Russo).

Nikolaeva, V.M. [In: Greze, V.N. (Ed.) Keys to the parasites of vertebrates of Black and Azov Seas. Parasitic invertebrates of fishes, fish-eating birds and marine mammals.] Kiev: Naukova Dumka 1975; 551 p (em Russo).

Nikolaeva VM. A revision of the subfamily *Koellikerinae*. Biol Mor 1978; 45: 65-71 (em Russo).

Nikolaeva VM. The specie composition morphology and distribution of Didymozoidae. Ekol Mor 1980a; 2: 81-85.

Nikolaeva, VM. On the black sea Didymozoidae species composition, morphology and distribution. Ekol Mor 1980b; 2: 81-85.

Nikolaeva VM. Trematodes Didymozoidae fauna, distribution and biology. In William J. Hargis, Jr, Parasitology and Pathology of Marine Organisms of the World Ocean, NOAA Technical Report 1985; 25: 667-672.

Nikolaeva VM, Dubina VR. On the Didymozoidae of fish in the western Indian Ocean "Concerning fauna Didymozoidae fishes from Western part of the Indian Ocean". Ekol Mor 1985; 20:13-26.

Nikolaeva VM, Tkachuk LP. Didymozoidae invasion in mackerels in the Indian Ocean. Ekol Mor 1982; 10: 44-49.

Noble GA. Description of *Nematobothrioides histoidii* (Noble, 1964) (Trematoda; Didymozoidae) and comparison with other genera. J Parasitol 1975; 61: 224-227

Oliva MM. New records of digenetic trematodes in marine fishes from Antofagasta. Cienc Tecnol Del Mar 1984; 8: 9-15.

Poche F. Einige Bemerkungen zur Nomenklatur der Trematoden. Zool. Anzeiger 1907; 31: 124-126.

Pascual S, Abollo E, Azevedo C. Host-parasite interaction of a muscle-infecting didymozoid in the Atlantic mackerel *Scomber scombrus* L. ICES J Mar Sci 2006; 63: 169–175.

Pozdnyakov SE. Sistematic position of some representatives of the subfamily Didymozoinae. In Gel'minty I vizyvaemye imizabolevaniya, edited by Mamaev, yu Vladivostock, USSR. Dae'nevostochnyi Nauchnyi Tsentrre ANCCCP 1987: 52-59, (em Russo).

Pozdnyakov SE. On systematic status of some genera of the subfamily Didymozoinae (Trematoda: Didymozoidae). Parazitologicheskie Issledovaniya. 1989: 113-119 (em Russo).

Pozdnyakov SE. Revision of the genus *Didymocystis* and the erected of the genus *Didymosulcus* gen. nov. (Trematoda: Didymozoidae). Zoologicheskii Zhurnal 1990a; 69: 5-12 (em Russo).

Pozdnyakov SE. Helminths of scombrid-like fishes of the world's Oceans. DVO ANSSSR, Vladivostok; 1990b (em Russo).

Pozdnyakov SE. Classification of trematodes of the suborder Didymozoata. Parazitologiya 1993; 27: 415-425 (em Russo).

Pozdnyakov SE. New species of didymozoid trematodes from mackerel tuna in the Atlantic Ocean. Parazitologiya 1994; 28: 170-173 (em Russo).

Pozdnyakov SE. Trematodes suborder Didymozoata. Vladivostok: Tikhookeanskii Nauchno-Issledovatel'Skii Rybokhozyaistvennyi Tsentr 1996 (em Russo).

Pozdnyakov SE, Gibson DI. Family Didymozoidae Monticelli, 1888. In: Keys to the Trematoda III. Edited by Bray, R. A., Gibson. D. I., London, UK. 2008.

Rego AA, Santos CP. Helminthofauna de cavalas, *Scomber japonicus* Houtt, do Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz 1983; 78: 443-448.

Reviewed distribution maps for *Thunnus obesus* (Bigeye tuna), with modelled year 2100 native range map based on IPCC A2 emissions scenario. www.aquamaps.org, version of Aug. 2016. Web. Accessed 14 Nov. 2018.

Rudolphi CA. Entozoorum synopsis cui accedent mantissa duplex et indices locupletissimi Sumptibus Augusti Rücker, Berlin 1819; 811 p.

Simões RO, Simões SBE, Luque JL, Iñiguez AM, Maldonado Júnior A . First Record of *Raillietina celebensis* (Cestoda: Cyclophyllidea) in South America: Redescription and Phylogeny. J Parasitol 2017; 103: 359-365.

Skrjabin KI. Trematódeos dos animais e do homem, Tratado de trematodologia. Akad Nauk SSSR Moscou, URSS 1955; 653 p (em Russo).

Skrjabin KI, Guschanskaja LK. [Suborder Hemiurata (Markevitsch, 1951) Skrjabin et Guschanskaja, 1954. First part.] In: Skrjabin KI (ed.) [Trematodes of animals and man.] Osnovy Trematodologii 1954; 9: 225-653 (em Russo).

Szidat L. La parasitologia como ciencia auxiliary para revelar problemas hidrobiológicos, zoogeográficos y geofísicos del Atlântico Sul. In: Excerta Parasitologica em Mem del Dr. Eduardo Caballero y Caballero. Universidad Nacional Autónoma de México 1960; 577-594.

Kumar S, Stecher G, Koichiro Tamura. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. Molecular Biology and Evolution 2015.

Tantaleán MV, Huiza AF. Sinopsis de los parásitos de peces marinos de la Costa Peruana. Biotempo 1994; 1: 53-101.

Thatcher WE. *Brasicystis bennetti* n. gen., n. sp. (Trematoda: Didymozoidae) Parasita da Pescada (Scianidae) da Amazônia, Brasil. Acta amazon 1979; 9: 747-749.

The IUCN Red List of Threatened Species. 2011.

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 Research 1994; 22: 4673 – 4680.

Timon-David J. Etude ser les trémetodes parasites des poissons du golfe de Marseille (Première liste). Bulletin de l'Institut Oceanographique 1937; 717: 1-24.

Traub RJ, Macaranas J, Mungthin M, Leelayoova S, Cribb T, Murrell D, Thompson RCA. A new PCR-based approach indicates the range of *Clonorchis sinensis* now extends to central Thailandia. PLOs one Neg Trop Dis 2009; 3: e367.

Williams Jr E, Bunkley-Williams L. Parasites of offshore big game fishes of Puerto Rico and the Western Atlantic. Antillean College Press 1996; 382 p.

Yamaguti S. Studies on the helminth fauna of Japan. Part 38. Trematodes of fishes. Arb Med Fak. 1951; 7: 315-334.

Yamaguti S. Systema helminthum I. The digenetic trematodes of vertebrates, Keigaku. Publishing Co., Tokyo, 1958; 1575 p.

Yamaguti S. New monogenetic trematodes from Hawaiian fishes, I. Pac Sci 1965; 19: 55-95.

Yamaguti S. The digenetic trematodes of Hawaiian fishes. Keigaku. Publishing Co., Tokyo, 1970; 436: 262 p.

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

Zagaglia CR. Técnicas de sensoriamento remoto aplicados à pesca de atuns no Atlântico Oeste Equatorial. Dissertação de Mestrado, INPE, São José dos Campos, Brasil, 2003; 180 p.

Zhu X, Gasser RB, Podolska M, Chilton NB. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. J Parasitol 1998; 28: 1911-1921 p.

10 ANEXOS

Anexo 1. Alinhamento completo *Didymosulcus philobranchiarca*.

	10	20	30	40	50
FJ628703 <i>D. wedli</i>				
FJ628704 <i>D. wedli</i>	TCCGGACCTATGGCTCCTTTCTAAGTTGCCCTGCTGTAGACTTGATGGTT				
FJ628705 <i>D. wedli</i>				
AB725625 <i>D. wedli</i>				
FJ628710 <i>D. wedli</i>				
FJ628711 <i>D. wedli</i>				
FJ628712 <i>D. wedli</i>				
FJ628713 <i>D. wedli</i>				
FJ628714 <i>D. wedli</i>				
FJ628715 <i>D. wedli</i>				
FJ628694 <i>D. irregularis</i>	A	T
FJ628695 <i>D. irregularis</i>	A	T
FJ628696 <i>D. irregularis</i>	A	T
FJ628697 <i>D. irregularis</i>	A	T
FJ628690 <i>D. palati</i>	A	T
FJ628691 <i>D. palati</i>	A	T
FJ628692 <i>D. palati</i>	A	T
FJ628693 <i>D. palati</i>	A	T
FJ628702 <i>D. palati</i>	A	T
FJ628716 <i>D. palati</i>	A	T
FJ628717 <i>D. palati</i>	A	T
FJ628718 <i>D. palati</i>	A	T
FJ628721 <i>D. palati</i>	A	T
FJ628677 <i>D. spirocauda</i>	A	T
FJ628678 <i>D. spirocauda</i>	A	T
FJ628679 <i>D. spirocauda</i>	A	T	A.....
DI05	T
DI15	T

	60	70	80	90	100
FJ628703 <i>D. wedli</i>				
FJ628704 <i>D. wedli</i>	GACAACCAATTGGCGTGGAAATGTACAGGGTCGTTGTTTCAGT-GGTTTCAGTA				
FJ628705 <i>D. wedli</i>				
AB725625 <i>D. wedli</i>				
FJ628710 <i>D. wedli</i>				
FJ628711 <i>D. wedli</i>				
FJ628712 <i>D. wedli</i>				
FJ628713 <i>D. wedli</i>				
FJ628714 <i>D. wedli</i>				
FJ628715 <i>D. wedli</i>				
FJ628694 <i>D. irregularis</i>				
FJ628695 <i>D. irregularis</i>				
FJ628696 <i>D. irregularis</i>				
FJ628697 <i>D. irregularis</i>				
FJ628690 <i>D. palati</i>				
FJ628691 <i>D. palati</i>				
FJ628692 <i>D. palati</i>				
FJ628693 <i>D. palati</i>				
FJ628702 <i>D. palati</i>				
FJ628716 <i>D. palati</i>				
FJ628717 <i>D. palati</i>				
FJ628718 <i>D. palati</i>				
FJ628721 <i>D. palati</i>				
FJ628677 <i>D. spirocauda</i>				
FJ628678 <i>D. spirocauda</i>				
FJ628679 <i>D. spirocauda</i>				
DI05	TG	T
DI15	TG	T

		110	120	130	140	150
FJ628703	<i>D. wedli</i>	TATATTGGTATGCTGATTCACGCCCTGTTCTTCTCACGTGGTTGTTTAT				
FJ628704	<i>D. wedli</i>				
FJ628705	<i>D. wedli</i>				
AB725625	<i>D. wedli</i>				
FJ628710	<i>D. wedli</i>				
FJ628711	<i>D. wedli</i>				
FJ628712	<i>D. wedli</i>				
FJ628713	<i>D. wedli</i>				
FJ628714	<i>D. wedli</i>				
FJ628715	<i>D. wedli</i>				
FJ628694	<i>D. irregularis</i>				
FJ628695	<i>D. irregularis</i>				
FJ628696	<i>D. irregularis</i>				
FJ628697	<i>D. irregularis</i>				
FJ628690	<i>D. palati</i>				
FJ628691	<i>D. palati</i>				
FJ628692	<i>D. palati</i>				
FJ628693	<i>D. palati</i>				
FJ628702	<i>D. palati</i>	A			
FJ628716	<i>D. palati</i>				
FJ628717	<i>D. palati</i>				
FJ628718	<i>D. palati</i>				
FJ628721	<i>D. palati</i>				
FJ628677	<i>D. spirocauda</i>		C		T
FJ628678	<i>D. spirocauda</i>		C		T
FJ628679	<i>D. spirocauda</i>		C		T
DI05		C			C
DI15		C			C

		160
FJ628703	<i>D. wedli</i>	CCGTTGCTGTCAG
FJ628704	<i>D. wedli</i>
FJ628705	<i>D. wedli</i>
AB725625	<i>D. wedli</i>
FJ628710	<i>D. wedli</i>
FJ628711	<i>D. wedli</i>
FJ628712	<i>D. wedli</i>
FJ628713	<i>D. wedli</i>
FJ628714	<i>D. wedli</i>
FJ628715	<i>D. wedli</i>
FJ628694	<i>D. irregularis</i>
FJ628695	<i>D. irregularis</i>
FJ628696	<i>D. irregularis</i>
FJ628697	<i>D. irregularis</i>
FJ628690	<i>D. palati</i>
FJ628691	<i>D. palati</i>
FJ628692	<i>D. palati</i>
FJ628693	<i>D. palati</i>
FJ628702	<i>D. palati</i>
FJ628716	<i>D. palati</i>
FJ628717	<i>D. palati</i>
FJ628718	<i>D. palati</i>
FJ628721	<i>D. palati</i>
FJ628677	<i>D. spirocauda</i>
FJ628678	<i>D. spirocauda</i>
FJ628679	<i>D. spirocauda</i>
DI05		..A...AA...
DI15		..A...AA...

	60	70	80	90	100
FJ628673 <i>D. semiglobularis</i>	GACAACCA	TGGCGT	TGGAAT	GTACAGGG	TCGTGGTTCAGTGGTTCAGTAT
FJ628674 <i>D. semiglobularis</i>
FJ628675 <i>D. semiglobularis</i>
FJ628676 <i>D. semiglobularis</i>
FJ628680 <i>D. pectoralis</i>
FJ628681 <i>D. pectoralis</i>
FJ628682 <i>D. pectoralis</i>
FJ628698 <i>D. alalongae</i>
FJ628699 <i>D. alalongae</i>
FJ628700 <i>D. alalongae</i>
FJ628701 <i>D. alalongae</i>
FJ628719 <i>D. lingualis</i>
FJ628720 <i>D. lingualis</i>
FJ628703 <i>D. wedli</i>
FJ628704 <i>D. wedli</i>
FJ628705 <i>D. wedli</i>
AB725625 <i>D. wedli</i>
FJ628710 <i>D. wedli</i>
FJ628711 <i>D. wedli</i>
FJ628712 <i>D. wedli</i>
FJ628713 <i>D. wedli</i>
FJ628714 <i>D. wedli</i>
FJ628715 <i>D. wedli</i>
FJ628694 <i>D. irregularis</i>
FJ628695 <i>D. irregularis</i>
FJ628696 <i>D. irregularis</i>
FJ628697 <i>D. irregularis</i>
FJ628690 <i>D. palati</i>
FJ628691 <i>D. palati</i>
FJ628692 <i>D. palati</i>
FJ628693 <i>D. palati</i>
FJ628702 <i>D. palati</i>
FJ628716 <i>D. palati</i>
FJ628717 <i>D. palati</i>
FJ628718 <i>D. palati</i>
FJ628721 <i>D. palati</i>
FJ628677 <i>D. spirocauda</i>
FJ628678 <i>D. spirocauda</i>
FJ628679 <i>D. spirocauda</i>
FJ628687 <i>P. alalongae</i>
FJ628688 <i>P. alalongae</i>
FJ628689 <i>P. alalongae</i>
AB725622 <i>Ko. apicalis</i>	T.....	A.....
FJ628683 <i>Ko. apicalis</i>	T.....	A.....
FJ628684 <i>Ko. apicalis</i>	T.....	A.....
FJ628685 <i>Ko. apicalis</i>	T.....	A.....
FJ628686 <i>Ko. apicalis</i>	T.....	A.....
FJ628706 <i>Ka. globosa</i>	T.....	A.....	A.....
FJ628707 <i>Ka. globosa</i>	T.....	A.....	C.A.....
AB725619 <i>Ka. globosa</i>	T.....	A.....
FJ628708 <i>Ka. renalis</i>	T.....	C.A.....
FJ628709 <i>Ka. renalis</i>	T.....	A.....
DI13	T.....

		110	120	130	140	150
					
FJ628673	<i>D. semiglobularis</i>	ATATTGGTATGTC	TGACTCACGCCCT	GTTCTTCTTAC	GTGGTTGTTTATC	
FJ628674	<i>D. semiglobularis</i>
FJ628675	<i>D. semiglobularis</i>
FJ628676	<i>D. semiglobularis</i>
FJ628680	<i>D. pectoralis</i>
FJ628681	<i>D. pectoralis</i>
FJ628682	<i>D. pectoralis</i>
FJ628698	<i>D. alalongae</i>
FJ628699	<i>D. alalongae</i>
FJ628700	<i>D. alalongae</i>
FJ628701	<i>D. alalongae</i>
FJ628719	<i>D. lingualis</i>	T.....	C.....
FJ628720	<i>D. lingualis</i>	T.....	C.....
FJ628703	<i>D. wedli</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628704	<i>D. wedli</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628705	<i>D. wedli</i>	T.....	T.....	C.....
AB725625	<i>D. wedli</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628710	<i>D. wedli</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628711	<i>D. wedli</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628712	<i>D. wedli</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628713	<i>D. wedli</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628714	<i>D. wedli</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628715	<i>D. wedli</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628694	<i>D. irregularis</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628695	<i>D. irregularis</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628696	<i>D. irregularis</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628697	<i>D. irregularis</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628690	<i>D. palati</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628691	<i>D. palati</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628692	<i>D. palati</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628693	<i>D. palati</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628702	<i>D. palati</i>	A.....	T.....	C.....
FJ628716	<i>D. palati</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628717	<i>D. palati</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628718	<i>D. palati</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628721	<i>D. palati</i>	T.....	T.....	C.....
FJ628677	<i>D. spirocauda</i>	T.....
FJ628678	<i>D. spirocauda</i>	T.....
FJ628679	<i>D. spirocauda</i>	T.....
FJ628687	<i>P. alalongae</i>	C.....
FJ628688	<i>P. alalongae</i>	C.....
FJ628689	<i>P. alalongae</i>	C.....
AB725622	<i>Ko. apicalis</i>	T.....
FJ628683	<i>Ko. apicalis</i>	T.....
FJ628684	<i>Ko. apicalis</i>	T.....
FJ628685	<i>Ko. apicalis</i>	T.....
FJ628686	<i>Ko. apicalis</i>	T.....
FJ628706	<i>Ka. globosa</i>	T.....	C.....	A.....
FJ628707	<i>Ka. globosa</i>	T.....	A.....	C.....
AB725619	<i>Ka. globosa</i>	T.....	A.....
FJ628708	<i>Ka. renalis</i>	T.....	A.....
FJ628709	<i>Ka. renalis</i>	T.....	A.....
DI13	

```

.....|.....|...
FJ628673 D. semiglobularis CGTTCGTCAGTCAG
FJ628674 D. semiglobularis .....
FJ628675 D. semiglobularis .....
FJ628676 D. semiglobularis .....
FJ628680 D. pectoralis .A.T...C....
FJ628681 D. pectoralis .A.T...C....
FJ628682 D. pectoralis .A.T...C....
FJ628698 D. alalongae .....
FJ628699 D. alalongae .....
FJ628700 D. alalongae .....
FJ628701 D. alalongae .....
FJ628719 D. lingualis ...T...T....
FJ628720 D. lingualis ...T...T....
FJ628703 D. wedli ...T...T....
FJ628704 D. wedli ...T...T....
FJ628705 D. wedli ...T...T....
AB725625 D. wedli ...T...T....
FJ628710 D. wedli ...T...T....
FJ628711 D. wedli ...T...T....
FJ628712 D. wedli ...T...T....
FJ628713 D. wedli ...T...T....
FJ628714 D. wedli ...T...T....
FJ628715 D. wedli ...T...T....
FJ628694 D. irregularis ...T...T....
FJ628695 D. irregularis ...T...T....
FJ628696 D. irregularis ...T...T....
FJ628697 D. irregularis ...T...T....
FJ628690 D. palati ...T...T....
FJ628691 D. palati ...T...T....
FJ628692 D. palati ...T...T....
FJ628693 D. palati ...T...T....
FJ628702 D. palati ...T...T....
FJ628716 D. palati ...T...T....
FJ628717 D. palati ...T...T....
FJ628718 D. palati ...T...T....
FJ628721 D. palati ...T...T....
FJ628677 D. spirocauda ...T...T....
FJ628678 D. spirocauda ...T...T....
FJ628679 D. spirocauda ...T...T....
FJ628687 P. alalongae .....
FJ628688 P. alalongae .....
FJ628689 P. alalongae .....
AB725622 Ko. apicalis .....
FJ628683 Ko. apicalis .....
FJ628684 Ko. apicalis .....
FJ628685 Ko. apicalis .....
FJ628686 Ko. apicalis .....
FJ628706 Ka. globosa .....G....
FJ628707 Ka. globosa .....C....
AB725619 Ka. globosa .....
FJ628708 Ka. renalis .....
FJ628709 Ka. renalis .....
DI13 .A.T...T....

```

