

**UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**Diagnóstico Morfológico e Molecular de Larvas de
Nematoides Anisquídeos (Ascaridoidea: Anisakidae) em
Peixes do Litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil**

Camila Santos Pantoja de Oliveira

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE LARVAS DE
NEMATOIDES ANISAQUÍDEOS (ASCARIDOIDEA: ANISAKIDAE) EM PEIXES
DO LITORAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL**

CAMILA SANTOS PANTOJA DE OLIVEIRA

Sob a Orientação do Professor
José Luis Fernando Luque Alejos

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2015

597.0524

O48d Oliveira, Camila Santos Pantoja de,
1988-

T

Diagnóstico morfológico e molecular de larvas de nematóides anisaquídeos (Ascaridoidea: Anisakidae) em peixes do litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil / Camila Santos Pantoja de Oliveira - 2015.

79 f.: il.

Orientador: José Luis Fernando Luque Alejos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 58-67.

1. Peixe - Parasito - Teses. 2. Nematoda - Teses. 3. Relação hospedeiro-parasito - Teses. 4. Parasitologia veterinária - Teses. I. Alejos, José Luis Fernando Luque, 1962-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

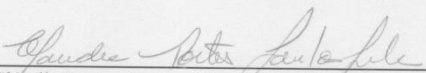
CAMILA SANTOS PANTOJA DE OLIVEIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

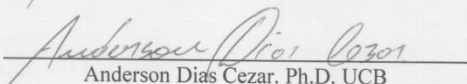
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23/02/2015



José Luis Fernando Luque Alejos. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)



Cláudia Portes Santos Silva. Ph.D. FIOCRUZ



Anderson Dias Cezar. Ph.D. UCB

*Aos meus pais, Jairo e Kátia,
aos meus irmãos, Diego, Carolina e Ariel,
às minhas amadas primas, Ester e Fernanda (em memória),
e ao meu amigo e namorado, Guilherme.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por abençoar minha vida e sempre iluminar o meu caminho.

Ao Prof. Dr. José Luis Fernando Luque Alejos, pela orientação e confiança que tornaram esse projeto possível.

À professora Dra. Cláudia Portes Silva Santos, por me receber tão gentilmente em seu laboratório, sendo sempre solícita e atenciosa. Muito obrigada pela orientação!

À professora Rita de Cássia Alves Alcântara de Menezes do DPA-UFRRJ, pela orientação na Iniciação Científica quando comecei a estudar Parasitologia Animal, que foi fundamental para que eu continuasse os estudos nesta área. Serei sempre grata!

À Dra. Aldenice Pereira, pelo apoio e ensinamentos quando eu comecei a estudar os parasitos de peixes.

Ao Dr. Fabiano Matos Vieira, pelos ensinamentos sobre os nematoides que contribuíram para a estruturação deste trabalho.

Ao Dr. Felipe Bisaggio Pereira, por me auxiliar nos estudos com os nematoides e nas análises filogenéticas que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental da FIOCRUZ, por terem me acolhido durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores da Estação Experimental W. O. Neitz UFRRJ, em especial, à Maristela Peckle, ao Marcus Sandes e à Cláudia Bezerra, que com toda paciência me ensinaram o princípio das análises moleculares.

Ao professor Douglas McIntosh do Laboratório de Biologia Molecular da UFRRJ, pelos ensinamentos na área da genética e por permitir a realização das análises moleculares.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia de Peixes da UFRRJ, Ana Carolina Silva, Fabiano Paschoal, Fernanda Cunha, Iris Soares, Juliana Moreira, Letícia Vidal, Naraiana Taborda, Philippe Vieira, Vanessa Pascoal e Vivian Suane pela companhia diária e todo apoio durante essa etapa. Agradeço pela amizade de todos vocês!

Às amigas Bianca Soares e Letícia Gabriela, pelos incentivos e alegrias proporcionados durante esses dois anos em Seropédica, RJ. Muito obrigada pela amizade!

A todos os professores, colegas e funcionários do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ.

A todos os meus amigos e familiares, especialmente à minha Vó Luiza, pelo apoio, carinho e torcida.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo financiamento deste estudo através do programa BIOTA-FAPERJ.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

DE OLIVEIRA, Camila Santos Pantoja. **Diagnóstico morfológico e molecular de larvas de nematoides anisquídeos (Ascaridoidea: Anisakidae) em peixes do litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.** 2015. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2015.

O presente trabalho teve como objetivo diagnosticar as larvas de nematoides anisquídeos em diferentes hospedeiros no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Entre março de 2013 e setembro de 2014 foram feitas necropsias de 146 espécimes de peixes, pertencentes à cinco ordens e dez famílias na costa de Cabo Frio (23°S, 42°W), Rio de Janeiro. No capítulo 1, as três espécies de Pinguipedidae (Actinopterygii, Perciformes) que ocorrem no Brasil, *Pseudoperca numida* Miranda-Ribeiro, 1903, *P. semifasciata* (Cuvier, 1829) e *Pinguipes brasilianus* Cuvier, 1829, foram examinadas para coleta de larvas de anisquídeos. Nenhum anisquídeo foi encontrado em *P. semifasciata*. Larvas de *Anisakis typica* (Diesing, 1860) e *Hysterothylacium* sp. foram reportadas em *P. numida*. Larvas de *Raphidascaris* sp. e *Hysterothylacium* sp. foram reportadas em *P. brasilianus*. *Pseudoperca numida* é um novo registro de hospedeiro para *A. typica*. Não foi possível identificar as espécies de *Hysterothylacium* e *Raphidascaris* devido à ausência de sequências similares de adultos depositadas no GenBank. No capítulo 2, larvas de *Hysterothylacium* spp. coletadas em *Caulolatilus chrysops* (Valenciennes, 1833), *Gymnothorax vicinus* (Castelnau, 1855), *Mentichirrus americanus* (Linnaeus, 1758), *Merluccius hubbsi* Marini, 1933, *Mullus argentinae* Hubbs & Marini, 1933, *P. brasilianus*, *Priacanthus arenatus* Cuvier, 1829, *Prionotus punctatus* (Bloch, 1793), *Sarda sarda* (Bloch, 1793), e *Zenopsis conchifer* (Lowe, 1852) provenientes da mesma localidade foram caracterizadas geneticamente. Quatro morfotipos foram encontrados para três genótipos diferentes. Não foi possível identificar em nível de espécie nenhum morfotipo devido à ausência de sequências similares de espécimes adultos depositadas no GenBank. Foram obtidas sequências parciais *cox-2* mtDNA e ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA destas larvas e comparadas com outras sequências disponíveis no banco de dados do GenBank. Em ambos os estudos a morfologia foi avaliada juntamente com a genética. Nas análises de *cox-2* mtDNA das larvas de *Hysterothylacium* sp. em *P. numida* (capítulo 1) e dos morfotipos 1 e 2 (capítulo 2) foram observadas alta similaridade entre nossas sequências de *Hysterothylacium* sp. com sequências de *Hysterothylacium deardorffoverstreetorum* Knoff, Felizardo, Iñiguez, Maldonado Jr, Torres, Pinto & Gomes, 2012. No entanto a análise filogenética mostrou a presença de clados distintos entre sequências de mesmo nome.

Palavras-chave: Anisakidae, *Hysterothylacium* spp., Sistemática.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Camila Santos Pantoja. **Morphological and molecular diagnosis of nematode anisakid larvae (Ascaridoidea: Anisakidae) in fishers from the coast of Rio de Janeiro state, Brazil.** 2015. 87 p. Dissertation (Master of Science in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The current work aimed to diagnose nematode anisakid larvae in different hosts from the coast of State of Rio de Janeiro, Brazil. Between March 2013 and September 2014 were made autopsies of 146 specimens of fish, belonging to five orders and ten families in Cabo Frio coast (23 ° S, 42 ° W) Rio de Janeiro State. In Chapter 1, the three species of Pinguipedidae (Actinopterygii, Perciformes) that occur in Brazil, *Pseudoperca numida* Miranda-Ribeiro, 1903, *P. semifasciata* (Cuvier, 1829) e *Pinguipes brasiliensis* Cuvier, 1829, were examined for collection of anisakid larvae. Anisakid larvae were not found in *P. semifasciata*. Larvae of *Anisakis typica* (Diesing, 1860) and *Hysterothylacium* sp. were reported in *P. numida*. Larvae *Raphidascaris* sp. and *Hysterothylacium* sp. were reported in *P. brasiliensis*. *Pseudoperca numida* is a new host record for *A. typica*. It was not possible to identify the species of *Hysterothylacium* *Raphidascaris* due to the lack of similar sequences of adults from GenBank database. In Chapter 2, larvae of *Hysterothylacium* spp. were collected in *Caulolatilus chrysops* (Valenciennes, 1833), *Gymnothorax vicinus* (Castelnau, 1855), *Mentichirrus americanus* (Linnaeus, 1758), *Merluccius hubbsi* Marini, 1933, *Mullus argentinae* Hubbs & Marini, 1933, *P. brasiliensis*, *Priacanthus arenatus* Cuvier, 1829, *Prionotus punctatus* (Bloch, 1793), *Sarda sarda* (Bloch, 1793) and *Zenopsis conchifer* (Lowe, 1852) from the same locality were genetically characterized. Four morphotypes were found for three different genotypes. Four morphotypes were found for three different genotypes. Identification of morphotypes to the species level is not possible due to absence of similar sequences in adult specimens deposited in GenBank. Partial sequences of *cox-2* mtDNA and ITS 1, 5.8S and ITS 2 rDNA were obtained these larvae and compared with other sequences available on GenBank database. In both studies the morphology was evaluated together with the genetic. In the analysis of *cox-2* mtDNA larvae of *Hysterothylacium* sp. in *P. numida* (Chapter 1) and morphotypes 1 and 2 (Chapter 2) were observed high similarity between our sequences with sequences of *Hysterothylacium deardorffoverstreetorum* Knoff, Felizardo Iñiguez, Maldonado, Jr. Torres, Pinto & Gomes, 2012. However phylogenetic analysis showed the presence of distinct clades of sequences of the same name.

Key words: Anisakidae, *Hysterothylacium* spp., Systematic.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Comparação dos valores médios (mm) e amplitude de variação da morfometria de larvas de <i>Anisakis</i> spp. do litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	15
Tabela 2. Comparação dos valores médios (mm) amplitude de variação da morfometria de larvas de <i>Raphidascaris</i> sp. do litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	24
Tabela 3. Comparação dos valores médios (mm) e amplitude de variação da morfometria de larvas de <i>Hysterothylacium</i> sp. do litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	26
Tabela 4. Lista das espécies de anisquídeos encontrados no atual estudo e espécies depositadas no GenBank utilizadas para comparação e construção das árvores filogenéticas a partir de dados de <i>cox-2</i> mtDNA e ITS, 5.8S e ITS 1 e 2 rDNA.....	27

CAPÍTULO II

Tabela 1. Peixes coletados e examinados para coleta de nematoides anisquídeos no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	45
Tabela 2. Comparação dos valores médios (micrômetros) e amplitude de variação da morfometria de larvas de quatro morfotipos de <i>Hysterothylacium</i> sp. parasitos de 10 espécies de hospedeiros do litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	50
Tabela 3. Lista das espécies de anisquídeos encontrados no atual estudo e espécies depositadas no GenBank utilizadas para comparação e construção das árvores filogenéticas.....	53

LISTAS DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Espécime de namorado *Pseudopercis numida* Miranda-Ribeiro, 1903 coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....8
- Figura 2.** Espécime de namorado *Pseudopercis semifaciata* (Cuvier, 1829) coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....9
- Figura 3.** Espécime de michole-quati *Pinguipes brasilianus* Cuvier, 1829 coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....10
- Figura 4.** (A) Região anterior com dente larval e poro excretor próximo aos lábios e (B) região posterior com mucro terminal de *Anisakis typica* (vista ventral) em *Pseudopercis numida*.....14
- Figura 5.** Árvore filogenética baseada no algoritmo de máxima verossimilhança entre a sequência de *Anisakis typica* obtida neste estudo (*) e sequências de espécies *Anisakis* spp. obtidas no GenBank a partir dados de *cox-2* mtDNA. Os números representam em porcentagem a confiabilidade dos resultados de parentesco obtidos “bootstrap”. *Ascaris lumbricoides* foi utilizado como grupo externo.16
- Figura 6.** Região anterior com poro excretor próximo ao anel nervoso. Ceco curto (A) e região posterior com cauda digitiforme e mucro terminal (B) de *Hysterothylacium* sp. (vista ventral) em *Pseudopercis numida*.....18
- Figura 7.** Árvore filogenética baseada no algoritmo de máxima verossimilhança entre sequências de *Hysterothylacium* sp. obtidas neste estudo (*) e sequências de *Hysterothylacium* spp. obtidas no GenBank a partir dados de *cox-2* mtDNA. Os números representam em porcentagem a confiabilidade dos resultados de parentesco obtidos “bootstrap”. *Cucullanus robustus* foi utilizado como grupo externo.....19
- Figura 8.** Árvore filogenética baseada no algoritmo de máxima verossimilhança entre sequência de *Hysterothylacium* sp. obtida neste estudo (*) e sequências de *Hysterothylacium* spp. obtidas no GenBank a partir de dados de ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA. Os números representam em porcentagem a confiabilidade dos resultados de parentesco obtidos “bootstrap”. *Ascaris lumbricoides* foi utilizado como grupo externo.....19
- Figura 9.** Região anterior com poro excretor próximo ao anel nervoso. Ceco curto (A) e região posterior com cauda do tipo digitiforme e mucro terminal (B) de *Hysterothylacium* sp. (vista ventral) em *Pinguipes brasilianus*.....21
- Figura 10.** Região anterior com dente larval bem visível e poro excretor localizado após o anel nervoso (A) e região posterior com finas estriações (B) de *Raphidascaris* sp. (vista ventral) em *Pinguipes brasilianus*.....23
- Figura 11.** Árvore filogenética baseada no algoritmo de máxima verossimilhança entre sequências de *Raphidascaris* sp. obtidas neste estudo (*) e sequências de *Raphidascaris* spp. obtidas no GenBank a partir dados de ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA. Os números representam em porcentagem a confiabilidade dos resultados de parentesco obtidos “bootstrap”. *Hysterothylacium aduncum* foi utilizado como grupo externo.....25

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Espécime de batata-da-pedra *Caulolatilus crhysops* (Valenciennes, 1833) coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....35
- Figura 2.** Espécime de michole-quati *Pinguipes brasilianus* Curvier, 1829 coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....36

Figura 3. Espécime de olho de cão <i>Priacanthus arenatus</i> Cuvier, 1829 coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	36
Figura 4. Espécime de papa terra <i>Menticirrhus americanus</i> (Linnaeus, 1758) (Fonte: Fishbase.org).....	37
Figura 5. Espécime de serra <i>Sarda sarda</i> (Bloch, 1793) coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	38
Figura 6. Espécime de carinha <i>Prionotus punctatus</i> (Bloch, 1793) coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	39
Figura 7. Espécime de merluza <i>Merluccius hubbsi</i> Marini, 1933 coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	39
Figura 8. Espécime de trilha <i>Mullus argentinae</i> Hubbs & Marini, 1933 coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	40
Figura 9. Espécime de moreia <i>Gymnothorax vicinus</i> (Castelnau, 1855) coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	41
Figura 10. Espécime de peixe galo <i>Zenopsis conchifer</i> (Lowe, 1852) coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	42
Figura 11. Região anterior com poro excretor próximo ao anel nervoso. Ceco intestinal longo (A) e região posterior com mucro terminal de <i>Hysterothylacium</i> sp. (vista ventral) em <i>Prionotus punctatus</i> , <i>Merluccius hubbsi</i> e <i>Gymnothorax vicinus</i>	46
Figura 12. Região anterior com poro excretor próximo ao anel nervoso. Ceco curto (A) e região posterior com mucro terminal de <i>Hysterothylacium</i> sp. (vista ventral) em <i>Caulolatilus chrysops</i> , <i>Menticirrhus americanus</i> , <i>Mullus argentinae</i> e <i>Zenopsis conchifer</i>	47
Figura 13. Região anterior com lábios em desenvolvimento, poro excretor próximo ao anel nervoso. Ceco longo (A) e região posterior com cauda com 5-7 espinhos terminais de <i>Hysterothylacium</i> sp. (vista ventral) em <i>Priacanthus arenatus</i> e <i>Sarda sarda</i>	48
Figura 14. Região anterior com lábios em desenvolvimento (A) e região posterior com cauda com incontáveis pequenos espinhos terminais de <i>Hysterothylacium</i> sp. (vista ventral) em <i>Pinguipes brasilianus</i>	49
Figura 15. Árvore construída a partir do modelo PHYML com sequências de <i>Hysterothylacium</i> spp. obtidas neste estudo (*) e sequências de <i>Hysterothylacium</i> spp. obtidas no GenBank, a partir dados de ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA. O número representa o suporte dos ramos pela probabilidade posterior Bayesiana (para 2×10^6 gerações; “bur-in” = 1×10^3). <i>Porrocacecum depressum</i> e <i>Pseudoternova decipiens</i> foram utilizados como grupos externo.....	51
Figura 16. Árvore construída a partir do modelo PHYML com sequências de <i>Hysterothylacium</i> spp. obtidas neste estudo (*) e sequências de <i>Hysterothylacium</i> spp. obtidas no GenBank, a partir dados de <i>cox-2</i> mtDNA O número representa o suporte dos ramos pela probabilidade posterior Bayesiana (para 2×10^6 gerações; “bur-in” = 1×10^3). <i>Ascaris lumbricoides</i> foi utilizado como grupo externo.....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I. DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE LARVAS DE ANISAQUÍDEOS (NEMATODA: ASCARIDOIDEA) EM <i>Pseudopericis numida</i> Miranda-Ribeiro, 1903 E <i>Pinguipes brasilianus</i> Cuvier, 1829 DO LITORAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL.....	
1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. <i>Pseudopericis numida</i>	8
1.2. <i>Pseudopericis semifasciata</i>	8
1.3. <i>Pinguipes brasilianus</i>	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
2.1. Procedência dos hospedeiros e coleta dos nematoides anisaquídeos.....	10
2.2. Análise morfológica.....	11
2.3. Análise molecular.....	11
2.3.1. Extração de DNA.....	11
2.3.2. Reações em cadeia da polimerase (PCR) das regiões intergênicas (ITS 1, 5.8S e ITS 2) do DNA ribossomal (rDNA).....	12
2.3.3. Reações em cadeia da polimerase (PCR) da região codificante da subunidade II da citocromo oxidase (<i>Cox-2</i> mtDNA).....	12
2.3.4. Visualização e purificação dos produtos amplificados pela PCR....	12
2.3.5. Determinação das sequências nucleotídicas.....	12
2.3.6. Análise computacional das sequências nucleotídicas.....	13
2.4. Análises estatísticas.....	13
3. RESULTADOS.....	13
3.1. <i>Pseudopericis numida</i>	13
3.1.1. <i>Anisakis typica</i>	13
3.1.2. <i>Hysterothylacium</i> sp.....	17
3.2. <i>Pinguipes brasilianus</i>	20
3.2.1. <i>Hysterothylacium</i> sp.....	20
3.2.2. <i>Raphidascaris</i> sp.....	22
4. DISCUSSÃO.....	28
CAPÍTULO II. DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE LARVAS DE <i>Hysterothylacium</i> spp. (ASCARIDOIDEA: ANISAKIDAE) EM 10 ESPÉCIES DE PEIXES NO LITORAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL.....	
1. INTRODUÇÃO.....	34
1.1. <i>Caulolatilus crhysops</i> (Valenciennes, 1833).....	34

1.2.	<i>Pinguipes brasilianus</i>	36
1.3.	<i>Priacanthus arenatus</i> Cuvier, 1829.....	36
1.4.	<i>Menticirrhus americanus</i> (Linnaeus, 1758).....	37
1.5.	<i>Sarda sarda</i> (Bloch, 1793).....	37
1.6.	<i>Prionotus punctatus</i> Bloch, 1793.....	38
1.7.	<i>Merluccius hubbsi</i> Marini, 1933.....	39
1.8.	<i>Mullus argentinae</i> Hubbs e Marini, 1933.....	39
1.9.	<i>Gymnothorax vicinus</i> (Castelnau, 1855).....	40
1.10.	<i>Zenopsis conchifer</i> (Lowe, 1852).....	41
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1.	Procedência dos hospedeiros e coleta dos nematoides anisquídeos.....	42
2.2.	Análise morfológica.....	43
2.3.	Análise molecular.....	43
2.3.1	Extração de DNA.....	44
2.3.2	Reações em cadeia da polimerase (PCR) das regiões intergênicas (ITS 1, 5.8S e ITS 2) do DNA ribossomal (rDNA).....	44
2.3.3	Reações em cadeia da polimerase (PCR) da região codificante da subunidade II da citocromo oxidase (<i>Cox-2</i> mtDNA).....	44
2.3.4	Visualização e purificação dos produtos amplificados pela PCR.....	44
2.3.5	Determinação das sequências nucleotídicas.....	44
2.3.6	Análise computacional das sequências nucleotídicas.....	45
3.	RESULTADOS.....	45
3.1.	<i>Hysterothylacium</i> sp. (L3) morfotipo I.....	45
3.2.	<i>Hysterothylacium</i> sp. (L3) morfotipo II.....	47
3.3.	<i>Hysterothylacium</i> sp. (L4) morfotipo III.....	48
3.4.	<i>Hysterothylacium</i> sp. (L4) morfotipo IV.....	49
4.	DISCUSSÃO.....	54
5.	CONCLUSÕES GERAIS.....	57
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Filo Nematoda é conhecido como o segundo grupo de metazoários com a maior quantidade de espécies do planeta, a maior parte delas desconhecidas (99,74%). Com estimativa que existam 10^6 espécies de nematoides, atualmente, o filo é composto por cerca de 256 famílias e mais de 40 000 espécies conhecidas, sendo um dos grupos de maior sucesso no Reino Animal (WILLIAMS; JONES 1994; BLAXTER, 2003; ANDERSON, 2000).

Os nematoides possuem distribuição cosmopolita e compõem parte considerável da biomassa e da diversidade de organismos. Com essas características, é um grupo com indubitavelmente grande importância ecológica e também econômica, uma vez que causam elevados danos, tanto ao nível das plantas como de animais (MOTA, 1989; WRIGHT, 1991; RUPPERT; BARNES, 1993; HODDA, 2007).

Dentre os nematoides de importância econômica e médico-veterinária, encontram-se os pertencentes à família Anisakidae Skrzjabin & Karokhin, 1945 que é considerada a mais numerosa e diversificada dentro de Ascaridoidea Railliet & Henry, 1915 e é representada por nematoides associados a organismos aquáticos (ANDERSON, 2000).

Os anisaquídeos são caracterizados por possuírem cutícula com ou sem cerdas. Esôfago com ventrículo posterior, apêndice ventricular presente ou ausente. Poro excretor situado entre a base do lábio subventral ou próximo ao anel nervoso. Sistema excretor assimétrico, restrito ao cordão lateral esquerdo. Ceco intestinal ausente ou presente e são parasitos de todas as classes de vertebrados (HARTWICH, 1974; MORAVEC, 1998). A transmissão desses nematoides depende do ambiente aquático e geralmente envolve invertebrados aquáticos e peixes como hospedeiros intermediários ou paratênicos, habitando o trato gastrointestinal dos seus hospedeiros definitivos (ANDERSON 2000).

Como qualquer representante de Ascaridoidea, os anisaquídeos apresentam as fases de ovo, L1, L2, L3, L4 (estádios de desenvolvimento) e adulta. Em fases larvais, os anisaquídeos podem estar presentes em pequenos crustáceos e moluscos que são ingeridos por peixes pequenos, e em seguida, por peixes maiores, e, finalmente, atingindo os seus hospedeiros definitivos, o que inclui tubarões, aves e mamíferos marinhos. Por exemplo, para espécies de *Anisakis* Dujardin, 1845, os hospedeiros definitivos são golfinhos e baleias, para espécies de *Contracaecum* Railliet e Henry, 1912, pássaros e pinípedes que se alimentam de peixes, para espécies de *Terranova* Leiper & Atkinson, 1914, tubarões, e para espécies de *Hysterothylacium* Ward e Magath, 1917, grandes teleósteos pelágicos predadores. O ciclo de vida de nematoides anisaquídeos envolve uma variedade importante e diversificada de hospedeiros, com certo grau de especificidade e distribuição geográfica no ecossistema marinho. Apesar de muitos estudos elucidarem as fases de desenvolvimento e os mecanismos de transmissão de alguns representantes da família Anisakidae, o ciclo biológico de muitas espécies continua desconhecido (MATTIUCCI et al., 1997; ANDERSON, 2000; TAVARES; LUQUE, 2006).

Esses nematoides foram relatados pela primeira vez parasitando peixes no século XIII, mamíferos marinhos no século XVII e causando doença em seres humanos no século XIX (MYERS, 1976; SMITH; WOOTEN, 1978). Em humanos, a infecção ocorre de forma acidental, resultando em uma doença parasitária denominada anisaquíase, comumente causada por *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809), *A. physeteris* (Baylis, 1923) e *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878) (AUDICANA et al., 2002; HOCHBERG; HAMER, 2010).

Os humanos podem adquirir a infecção através da ingestão de peixes ou produtos de pesca crus ou mal cozidos contaminados com as larvas (SAKANARI; MCKERROW, 1989; NADLER et al., 2005; AUDICANA; KENNEDY, 2008). Após a ingestão, as larvas não se desenvolvem nos seres humanos, no entanto, elas podem penetrar no trato gastrointestinal e formar granulomas eosinofílicos, frequentemente com consequências patológicas

(MATTIUCCI et al., 2013). Há uma consciência crescente de que estes parasitos geram reações alérgicas potencialmente fatais (AUDICANA; KENNEDY, 2008). Estas reações denominadas anisakiase gastroalérgica são caracterizadas por urticária, que geralmente ocorrem nos braços e abdômen, e por angioedema ou anafilaxia (DASCHNER et al., 2011). Segundo Audicana et al. (2002), a sensibilização ao parasito pode ocorrer sem que haja a infecção, e que antígenos purificados de *A. simplex* são suficientes para causar este tipo de anafilaxia. Segundo os mesmos autores, esses alergênicos são resistentes ao calor e ao congelamento, não diminuindo assim o seu potencial zoonótico.

O primeiro caso da doença foi reportado na Holanda, em 1955 por Straub (VAN THIEL et al., 1960), seguido por infecções generalizadas no Japão, e casos menos frequentes nos Estados Unidos, Canadá e alguns países da Europa, como Áustria, Itália e Espanha (NAWA et al., 2005; MATTIUCCI et al. 2013).

Atualmente, um total de 2.000 casos de anisakiase é reportado a cada ano no mundo, sendo mais de 90% dos casos ocorridos no Japão (ARAI et al., 2014). No Brasil, não há relatos da doença até o momento (AMATO-NETO et al., 2007), porém sabe-se que há condições para que a doença se estabeleça, visto que esses parasitos já foram relatados em diversos peixes no país e também devido à grande aceitação da culinária oriental, na qual são consumidos peixes crus. Este hábito crescente constitui uma situação de risco, denotando a necessidade de ações em vigilância sanitária através da inspeção do pescado, a fim de identificar, monitorar e inviabilizar a instalação de helmintíases emergentes (BARROS et al., 2006).

De acordo com a classificação de Hartwich, 1974, a família Anisakidae é composta por três subfamílias, Anisakinae Railliet e Henry, 1912, Goeziinae Travassos, 1919 e Raphidascaridinae Hartwich, 1954, com um grande número de gêneros (HARTWICH, 1974; MORAVEC, 1998; McCLELLAND, 2005). Os mais estudados em peixes, entre outros, são *Anisakis*, *Hysterothylacium* e *Raphidascaris* Railliet e Henry, 1914, sendo o primeiro o mais citado na literatura devido à sua grande relação com a saúde pública.

O gênero *Anisakis* possui o ciclo de vida heteroxeno, incluindo 4 estádios larvais. Este parasito utiliza crustáceos como primeiro hospedeiro intermediário e moluscos e peixes como segundo hospedeiros intermediários. Quando estes, contendo a larva infectante, são ingeridos por seus hospedeiros definitivos se tornam adultos (KLIMPEL et al., 2004). Tipicamente, os hospedeiros definitivos são cetáceos das famílias Delphinidae, Ziphiidae, Physeteridae e Kogiidae, porém espécies de Balaenopteridae, Pontoporidae, Monodontidae, Phocoenidae, Neobalaenidae e até mesmo Otariidae são conhecidos por ser infectado (KLIMPEL et al. 2004; NADLER et al. 2005; MATTIUCCI; NASCETTI 2008; KUHN et al. 2011).

A diagnose das larvas deste gênero é feita a partir das características diferenciais, tais como, poro excretor localizado próximo à abertura oral, ventrículo muito desenvolvido, ceco intestinal e apêndice ventricular ausentes (TAVARES; LUQUE, 2006).

O gênero possui dois tipos larvais: *Anisakis* tipo I e tipo II, que são diferenciados por caracteres morfométricos do ventrículo e por possuir ou não mucro (BERLAND, 1961). A aplicação de métodos moleculares para estudos taxonômicos do gênero *Anisakis* indicam que estes dois tipos possuem nove espécies distintas, divididas em dois grandes clados, com diferentes hospedeiros preferenciais, ecologia e zoogeografia. O primeiro clado inclui *A. simplex*-complex (*A. simplex sensu stricto* [s.s.], *A. pegreffii* Campana-Rouget & Biocca, 1955, *A. berlandi* (*A. simplex* C) Mattiucci, Cipriani, Webb, Paoletti, Marcer, Bellisario, Gibson & Nascetti, 2014, *A. typica* (Diesing, 1860) e duas espécies irmãs *A. nascettii* Mattiucci, Paoletti & Webb, 2009 e *A. ziphidarum* Paggi, Nascetti, Webb, Mattiucci, Cianchi & Bullini, 1998. O segundo clado consiste de *A. physeteris*-complex (*A. brevispiculata*, Dollfus, 1966, *A. paggiae* Mattiucci, Nascetti, Dailey, Webb, Barros, Cianchi & Bullini, 2005 e *A. physeteris*) (MATTIUCCI et al. 2009, KLIMPEL et al. 2011, KUHN et al. 2011;

MATTIUCI et al., 2014). Deste modo, com a utilização apenas de caracteres morfológicos não é possível associar larvas deste gênero com apenas uma espécie (SAAD et al., 2012).

Parasitas *Anisakis* spp. podem ser encontrados na maioria dos oceanos e mares. No Brasil, quatro espécies já foram reportadas, *A. typica*, ocorrendo em *Sotalia fluviatilis* Gervais, 1853, *Stenella longirostris* Gray, 1828, *Auxis thazard* Lacépède, 1800 e *Trichiurus lepturus* Linneaus, 1758, *A. physeteris* em *A. thazard*, *A. nascettii* em *Mesoplodon europaeus* (Gervais, 1855) e *A. paggiae* em *Kogia sima* (Owen, 1866) (MATTIUCI et al., 2002; MATTIUCI; NASCETTI, 2008; IÑIGUEZ et al., 2009 e 2011; BORGES et al., 2012; DI AZEVEDO et al., 2014; 2015).

Hysterothylacium é o maior gênero da superfamília Ascaridoidea, e um grupo diversificado dentro da família Anisakidae. Adultos deste gênero são parasitos comuns no trato digestivo de peixes marinhos, de água salobra e de água doce (DEARDORFF; OVERSTREET, 1980; BRUCE et al., 1994; LI et al., 2007). As larvas são relatadas amplamente nos tecidos de uma variedade de peixes e invertebrados marinhos (incluindo gastrópodes, lulas, caranguejos e camarões) que servem como hospedeiros intermediários (DEARDORFF; OVERSTREET, 1981).

Espécies desse gênero apresentam uma grande variação na morfologia da cauda, no sistema excretor e nas asas laterais, que podem estar presentes ou ausentes (BRUCE; CANNON, 1990). A diagnose das larvas é feita a partir das características diferenciais, tais como, poro excretor localizado próximo ao anel nervoso, ventrículo pouco desenvolvido, apêndice ventricular presente, ceco intestinal presente e cauda com mucro (TAVARES; LUQUE, 2006).

De acordo com Moravec et al. (2012) existem 66 espécies válidas de *Hysterothylacium* reportadas no mundo. Desde então, mais 5 novas espécies foram descritas: *H. deardorffoverstreetorum* Knoff, Felizardo, Iniguez, Torres, Pinto & Gomes, 2012, *H. longilabrum* Liu, Li & Zhang, 2012, *H. zhoushanense* Liu, Liu & Zhang, 2012, *H. simile* Li, Zhang e Liu, 2013 & *H. gibsoni* Xu, Li & Zhang, 2014. Todas as espécies do gênero foram descritas a partir de peixes, exceto *H. burtti* Raffel & Anderson, 2000, encontrado em anfíbio (RAFFEL; ANDERSON, 2009; KNOFF et al. 2012; LI et al. 2012a,b, 2013; GUO et al. 2014; XU et al., 2014)

Na América do Sul, espécies de *Hysterothylacium* têm sido reportadas no Equador, *H. corrugatum* Deardorff & Overstreet, 1981, Argentina *H. rhamdiae* Brizzola & Tanzola, 1995, *H. patagonense* Moravec, Urawa & Coria, 1997, *H. aduncum* (Rudolphi, 1802) e *H. spirale* Rossin, Datri, Incorvaia & Timi, 2011, no Chile *H. geshei* Torres, Andrade & Silva, 1998, *H. winteri* Torres & Soto, 2004 e *H. aduncum* e, no Brasil *H. fortalezae* (Klein, 1973), *H. reliquens* (Norris & Overstreet, 1975) e *H. deardorffoverstreetorum* (ROSSIN, et al., 2011; KNOFF et al., 2012;)

As espécies de *Raphidascaaris* são parasitas de peixes teleósteos, utilizando-os como hospedeiros intermediários, paratênicos ou definitivos (HARTWICH, 1974; SMITH, 1984a). De acordo com a classificação atual, o gênero inclui dois subgêneros: *Sprentascaaris* Petter e Cassone 1984 e *Raphidascaaris* (MORAVEC, 1998; MORAVEC; NAGASAWA 2000). No Brasil, são reportadas 4 espécies do gênero *Raphidascaaris* parasitando peixes marinhos, *R. acus* Bloch, 1779, *R. atlanticus* Rodrigues, 1974, *R. yamagutii* Vicente & Santos, 1974 e *R. vicentei* Santos, 1970. No entanto, Smith (1984) considera *A. atlanticus* e *R. yamagutii* sinônimos de *R. vicentei*. A diagnose das larvas deste gênero é feita a partir das características diferenciais, tais como, ventrículo pouco desenvolvido, apêndice ventricular presente, ceco intestinal e mucro ausentes e poro excretor próximo ao anel nervoso (TAVARES; LUQUE, 2006)

A identificação precisa de um parasito em qualquer fase de seu desenvolvimento tem implicações muito importantes para o estudo da epidemiologia e sistemática (KIJEWSKA et

al., 2002). Descrever nematoides adultos da ordem Ascaridida apenas com base em caracteres morfológicos, às vezes, é problemático por causa da existência de grupos irmãos e espécies crípticas que são presentes neste grupo, sendo assim, quase não podem ser separadas entre si utilizando apenas estudos morfológicos (MATTIUCCI et al., 1997; ZHU et al., 2002; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2003; Li et al., 2005; MATTIUCCI 2008 et al., 2010). A identificação morfológica das larvas também não é prática e nada confiável, como elas são geralmente muito semelhantes entre si, morfológicamente, muitas características taxonômicas significativas não estão totalmente desenvolvidas (MORAVEC, 1998).

A caracterização genética de populações e espécies tem melhorado a taxonomia de anisaquídeos (por exemplo, o conhecimento de novas espécies e/ou espécies crípticas, testes de hipóteses e a identificação de todas as fases de vida de espécies), a compreensão de associações ecológicas (por exemplo, relação parasito/hospedeiro, coespeciação, hospedeiros preferenciais e distribuição geográfica), e diagnóstico da doença (por exemplo, o diagnóstico molecular de casos da doença e desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico) (CAVALLERO et al., 2011).

No Brasil, a maioria dos trabalhos sobre larvas de nematoides anisaquídeos feitos anteriormente foi com abordagem morfológica. Assim, os resultados destes trabalhos se esbarrraram no chamado “impedimento taxonômico”. Poucos estudos foram feitos utilizando a integração de dados genéticos e morfológicos e assim puderam identificar de forma confiável as larvas de anisaquídeos.

O objetivo do presente trabalho foi diagnosticar os anisaquídeos parasitos de diferentes hospedeiros no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, para conhecimento da biodiversidade deste grupo na costa do país. Os resultados obtidos foram divididos em dois capítulos que visaram responder as diferentes questões sobre os anisaquídeos no Rio de Janeiro. No capítulo I foi feito o estudo morfológico e molecular das larvas de anisaquídeos encontradas em duas espécies de peixes da família Pinguipedidae (Actinopterygii, Perciformes), *Pseudopercis numida* Miranda-Ribeiro, 1903 e *Pinguipes brasilianus* Cuvier, 1829. No capítulo II foi feito o estudo morfológico e molecular das larvas de *Hysterothylacium* spp. parasitos de *Caulolatilus chrysops* (Valenciennes, 1833), *Gymnothorax vicinus* (Castelnau, 1855), *Pinguipes brasilianus*, *Prionotus punctatus* Bloch, 1793, *Priacanthus arenatus* Cuvier, 1829, *Mullus argentinae* Hubbs e Marini, 1933, *Sarda sarda* (Bloch, 1793), *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758), *Zenopsis conchifer* (Lowe, 1852) e *Merluccius hubbsi* Marini, 1933.

CAPÍTULO I –

DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE LARVAS DE NEMATOIDES ANISAQUÍDEOS (ASCARIDOIDEA: ANISAKIDAE) EM *Pseudoperca numida* Miranda-Ribeiro, 1903 E *Pinguipes brasiliensis* Cuvier, 1829 DO LITORAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

RESUMO

Dados morfológico, quantitativo e genético das larvas de parasitos Anisakidae em *Pseudopercis numida* e *Pinguipes brasilianus* coletados em Cabo Frio (23 ° S, 42 ° W), Rio de Janeiro, Brasil, foram reportados. Vinte e cinco espécimes de *P. numida* e vinte e cinco espécimes de *P. brasilianus* foram necropsiados e 352 larvas foram coletadas, sendo encontrado 1 *Anisakis* sp., 344 *Hysterothylacium* sp. e 7 *Raphidascaris* sp. Apresentamos sequencias de mtDNA de *Anisakis* sp. e *Hysterothylacium* sp. E sequências de ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA de *Hysterothylacium* sp. e *Raphidascaris* sp. Os perfis morfológicos e genéticos confirmaram *A. typica*. Sequências de *Hysterothylacium* sp. e *Raphidascaris* sp. não confirmaram a espécie, devido à ausência de sequências similares de adultos. Sequência de mtDNA de *Hysterothylacium* sp. de *P. numida* mostrou alta similaridade com *H. deardorffoverstreetorum*, no entanto análise filogenética demonstrou a presença de dois clados, ambos de *H. deardorffoverstreetorum*. Novo registro foi fornecido para *A. typica* em *P. numida*. Todas as sequências geradas no presente estudo foram depositadas no GenBank.

ABSTRACT

The morphological, quantitative and genetic data of the larvae of Anisakidae in *Pseudoperca numida* and *Pinguipes brasiliensis* were recorded from the coast off Cabo Frio (23°S, 42°W), Rio de Janeiro State, Brazil. Twenty-five specimens of *P. numida* and twenty-five specimens of *P. brasiliensis* were necropsied, and 352 larvae collected, has been found 1 *Anisakis* sp., 344 *Hysterothylacium* sp. and 7 *Raphidascaris* sp. We present the mtDNA sequence data of *Anisakis* sp. and *Hysterothylacium* sp. Sequence ITS ribosomal DNA (rDNA) of *Hysterothylacium* sp. and *Raphidascaris* sp. The morphological and genetic profiles confirmed *A. typica*. Sequences of *Hysterothylacium* sp. and *Raphidascaris* sp. were not identified to the species level due to the absence of similar sequences of adult parasites. mtDNA sequence of *Hysterothylacium* sp. of *P. numida* showed high similarity with sequence of *H. deardorffoverstreetorum*, however phylogenetic analysis demonstrated the presence of two clades, both of them under the same name as the larval *H. deardorffoverstreetorum*. New records are provided for *A. typica* from *P. numida*. All sequences generated in this study were deposited in GenBank.

1. INTRODUÇÃO

A família Pinguipedidae (Actinopterygii, Perciformes) é representada por sete gêneros e oitenta e duas espécies, que se distribuem pelo Atlântico da América do Sul, África e Pacífico. No litoral do Brasil, ocorrem dois gêneros representados por três espécies, *Pseudoperca numida* Miranda-Ribeiro, 1903, *Pseudoperca semifasciata* (Cuvier, 1829) e *Pinguipes brasilianus* Cuvier, 1829, que são peixes de hábitat demersal encontrados em águas profundas da plataforma, sendo raramente encontradas próximo ao litoral (FROSE; PAULY, 2014).

1.1. *Pseudoperca numida*

Pseudoperca numida, vulgarmente conhecido como namorado (Figura 1), possui sete espinhos dorsais e a sua coloração varia nos machos em dois terços superiores escuros e de tons de azul a oliva, marrom a cinza; um terço inferior é branco; numerosas manchas brancas, redondas, por todo corpo e na região central dorsal, onde formam uma faixa; há exemplares totalmente escuros. Fêmeas marrons a marrom amareladas, ventre e face brancos; frequentemente com barras escuras indistintas nos flancos, em número de 4-6. Chegam a pouco mais de 1,5 m de comprimento, pesando até 47 kg e podem viver cerca de 30 anos. É um peixe de corpo alongado, roliço, cabeça robusta, focinho curto e arredondado.

Sua distribuição ocorre desde o litoral do Estado do Rio de Janeiro até as águas argentinas é uma importante espécie de captura comercial e pesca esportiva no Sudeste do Brasil (MENEZES; FIGUEIREDO, 1985; ROSA; ROSA, 1997; CARVALHO-FILHO, 1999; FROESE; PAULY, 2014).



Figura 1. Espécime de namorado *Pseudoperca numida* Miranda-Ribeiro, 1903 coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

1.2. *Pseudoperca semifasciata*

Pseudoperca semifasciata, vulgarmente conhecido como namorado (Figura 2), possui quatro a seis espinhos dorsais a sua coloração varia de marrom a cinza, um terço inferior do corpo é branco, o dorso azulado; possui de 5-6 faixas escuras, largas e verticais, no flanco, não invadindo a área branca; numerosas manchas escuras esparsas, por vezes formando linhas

longitudinais no dorso e flanco, entre as faixas escuras; cabeça amarela superiormente, faces com áreas amarelas, laranja e azulada, lábios amarelo-alaranjados a pálidos; duas linhas escuras do focinho ao opérculo; peitoral e caudal laranja-amarelada, com uma mancha escura superior na sua base; pélvica branca, dorsal escura, anal azulada. Atinge até 1 metro e 10 kg.

Sua distribuição ocorre do litoral do Estado de São Paulo até o Golfo de São Jorge na Argentina. É uma importante espécie de captura acidental em redes de arrasto de fundo que tem como alvo a pescada *Merluccius hubbsi* na costa da Patagônia, e no Brasil, apesar de não ser encontrado comumente, também é um peixe de grande importância comercial (ROSA; ROSA, 1997; ELIAS; BURGOS, 1988; CARVALHO-FILHO, 1999; FROESE; PAULY, 2014).



Figura 2. Espécime de namorado *Pseudoperca semifasciata* (Cuvier, 1829) coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

1.3. *Pinguipes brasilianus*

Pinguipes brasilianus, vulgarmente conhecido como michole-quati (Figura 3), possui nadadeira dorsal com 7 espinhos e 26 a 27 raios e nadadeira anal com 75 a 26 raios; 94 a 95 fileiras transversais de escamas entre o ângulo superior do opérculo e a base da nadadeira caudal. Corpo escuro, com a região ventral mais clara. Tronco com cerca de 7 faixas transversais escuras largas e outras mais estreitas entre estas. Este padrão fica mais bem definido na metade inferior do corpo. Nadadeira dorsal com uma faixa escura longitudinal na parte distal um a faixa clara submarginal longitudinal na parte mole e a margem com um a linha escura. Anal mais escura junto à margem. Caudal com uma mancha arredondada superiormente na região basal. Atinge até 40 centímetros

É um peixe de baixo valor comercial, sem importância econômica. Sua distribuição é desde o litoral do Estado do Rio de Janeiro até Mar del Plata, Argentina (MENEZES; FIGUEIREDO, 1985; ROSA; ROSA, 1997; SZPILMAN, 2000; FROESE; PAULY, 2014).



Figura 3. Espécime de michole-quati *Pinguipes brasilianus* Cuvier, 1829 coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Estudos relativos à parasitofauna de pinguipedídeos realizados anteriormente apresentaram um grande número de ocorrências de larvas de anisaquídeos. Em *P. numida*, foram registradas larvas pertencente a 4 gêneros, *Anisakis* Dujardin, 1845, *Hysterothylacium* Ward e Magath, 1917, *Raphidascaris* Railliet & Henry, 1914 e *Terranova* Leiper & Atkinson, 1914. Enquanto em *P. semifasciata* os mesmos gêneros foram encontrados, exceto *Anisakis*. Em *P. brasilianus* foram registradas larvas de *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809), dos gêneros *Terranova*, *Hysterothylacium*, *Pseudoterranova* Mozgovoy, 1951, *Raphidascaris* e adultos de *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (LUQUE et al. 2008; TIMI et al. 2008, 2010). Estes estudos foram de cunho ecológico e não fizeram uma descrição detalhada dos anisaquídeos.

Objetivo deste estudo foi identificar os anisaquídeos coletados a partir das espécies de pinguipedídeos que ocorrem no Brasil utilizando juntamente metodologias morfológica e molecular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedência dos hospedeiros e coleta dos nematoides anisaquídeos

Um total de 66 espécimes de peixes da família Pinguipedidae, sendo 25 *P. numida*, 16 *P. semifasciata* e 25 *P. brasilianus*, obtidos no CEASA (Centrais Estaduais de Abastecimento), na cidade do Rio de Janeiro, RJ, sendo capturados por pescadores profissionais na costa de Cabo Frio (23°S, 42°W), Rio de Janeiro entre março de 2013 e janeiro de 2014. Os peixes foram mantidos em caixas térmicas com gelo, transportados até o Laboratório de Parasitologia de Peixes (UFRRJ) e imediatamente foram feitas as necropsias. A identificação dos peixes foi feita segundo Rosa e Rosa (1997). As necropsias foram feitas através de uma incisão ventral desde a abertura anal até a linha do opérculo, expondo a cavidade corporal. Todos os órgãos internos foram individualizados, colocados em placa de *Petri*, regados com solução salina fisiológica 0,65% NaCl, e posteriormente examinados através estereoscópico para coleta dos anisaquídeos.

2.2. Análise morfológica

Para análise morfológica, os anisquídeos foram fixados em formalina 5% e após 48h, foram transferidos para etanol 70%. Para os estudos de microscopia de luz, foram feitas as montagens das lamínas onde os nematoides foram clarificados em lactofenol de Amann (1:1:2:1 de fenol; ácido láctico: glicerina: água), e posteriormente foram feitas as medições no microscópio Olympus BX51 através do software Cell^R&Cell^RImaging Life Science Microscopy. As medidas (média seguida pela amplitude entre parênteses) foram dadas em milímetros. Os desenhos foram feitos com o auxílio de um tubo de desenho anexado ao microscópio de contraste de fases Olympus BX53. A identificação e classificação dos anisquídeos em nível de gênero foi feita segundo Anderson (2000) e Luque et al. (2011). Os anisquídeos encontrados no presente estudo foram comparados com outros da mesma localidade a partir de outros hospedeiros.

2.3. Análise molecular

Para análise molecular, alguns nematoides anisquídeos foram partidos em três partes. As partes anterior e posterior foram fixadas em formalina 5% também foram caracterizadas morfológicamente. A parte mediana do corpo foi fixada em álcool 80° GL para posterior extração de DNA.

2.3.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Billings et al. (1998), modificado como descrito a seguir: as amostras foram lavadas três vezes em água ultrapura antes da realização da extração de DNA. Em seguida foram maceradas com o auxílio de uma ponteira estéril em 200µl de tampão de digestão (NaCl 0,1M; TRIS-HCl 0,21M pH 8,0; EDTA 0,05M e SDS 0,5%) e incubadas por 30 minutos a 37°C. Foram adicionados 20µl de Proteinase K (20mg/mL - Promega) e as amostras foram incubadas a 55°C por 12h com homogeneizações ocasionais.

Após a digestão seguiu-se a etapa com fenol/clorofórmio na qual foram adicionados 200µL de fenol, agitou-se os microtubos por 5 minutos por inversão. Após agitação os microtubos foram centrifugados a 14000rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para um microtubo novo estéril. Foram adicionados 100µL de fenol e 100µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Agitou-se por 5 minutos os microtubos por inversão e depois foram centrifugados a 14000rpm por 2 minutos. Este passo foi repetido por 3 vezes. Em seguida foram adicionados 200µL clorofórmio/álcool isoamílico e centrifugou-se por 14000rpm por 2 minutos e o sobrenadante resultante transferido para um novo microtubo de 1,5mL.

O DNA foi precipitado em 400µL de etanol 100% “overnight” a -20°C. Após a precipitação, as amostras foram retiradas do freezer e centrifugadas a 14000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 400µL de etanol 70%. Após a lavagem e homogeneização por inversão as amostras foram centrifugadas a 14000rpm por 10 minutos e o etanol 70% foi descartado. O pellet foi deixado para secar por 30 minutos. O DNA foi ressuscitado em 30µL de água ultrapura. O DNA foi em seguida quantificado em espectrofotômetro Biowave DNA (Biochrom, Cambridge, UK) e armazenado a 4°C até a amplificação.

2.3.2. Reações em cadeia da polimerase (PCR) das regiões intergênicas (ITS 1, 5.8S e ITS 2) do DNA ribossomal (rDNA)

Para reação em cadeia da polimerase (PCR) para ITS 1, 5.8S e ITS 2 do rDNA foram utilizados os oligonucleotídeos NC5 (Forward; 5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3') e NC2 (Reverse; 5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT 3') desenhados por Zhu et al. (1998). O volume final da reação foi de 25 µl, sendo 2,5 µl de tampão de reação (10X), 1,5 µl de MgCl₂ (50mM), 2,5 µl de dNTP's (2,5mM), 2,5 µl de primers (10mM), 1 unidade de Taq DNA polimerase (5 unidades por 1 microlitro), 13,8 µl de H₂O e 2,5 µl de DNA extraído. As amostras foram colocadas no termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf) e submetidas às seguintes condições: pré-aquecimento 94°C por 30 segundo, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (anelamento), 72°C por 30 segundos (extensão) e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

2.3.3. Reações em cadeia da polimerase (PCR) da região codificante da subunidade II da citocromo oxidase (*Cox-2* mtDNA)

Para reação em cadeia da polimerase (PCR) da região *cox-2* mtDNA foram utilizados os oligonucleotídeos 211 (5'- TTTTCTAGTTATATATAGATTGRTTTYAT) e 210 (Reverse; 5'- CACCAACTCTTAAAATTATC- 3') desenhados por Nadler e Hudspeth (2000). O volume final da reação foi de 25µl, sendo 2,5µl de tampão de reação (10X), 2µl de MgCl₂ (50mM), 2µl de dNTP's (2,5mM), 4µl de primers (10mM), 2 unidades de Taq DNA polimerase (5 unidades por 1 microlitro), 12.1 µl de H₂O e 2 µl de DNA extraído. As amostras foram colocadas no termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf) e submetidas às seguintes condições: pré-aquecimento 94°C por 30 segundo, seguido de 34 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 46°C por 60 segundos (anelamento), 72°C por 90 segundos (extensão) e um ciclo final de 72°C por 10 minutos.

2.3.4. Visualização e purificação dos produtos amplificados pela PCR

O produto da PCR foi visualizado com Sybergreen (Invitrogen, Eugene, OR, USA) em gel de agarose a 1,5%. Todos os produtos amplificados durante a PCR foram purificados com o Kit Wizard SV gel e PCR clean up system kit (Promega, Madison, WI, USA) seguindo as instruções do fabricante.

2.3.5. Determinação das sequências nucleotídicas

A partir dos produtos purificados foram realizadas as reações de sequenciamento de DNA com o conjunto de diagnóstico ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems-Perkin Elmer) de acordo com o protocolo utilizado pela plataforma PDTIS- Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz como segue: 1µl de Big Dye, 1,5µl de tampão, oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 3.2 pmol/µl, 2µl de produto da PCR purificado e água para completar a reação para o volume final de 10µl. A reação foi submetida ao mesmo ciclo de sequenciamento e depois seqüenciadas em ambas as fitas com o uso do seqüenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems-Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA) da plataforma PDTIS-Fiocruz.

2.3.6. Análise computacional das sequências nucleotídicas

As sequências foram obtidas em forma de cromatogramas e analisadas no programa DNA STAR SeqMAN (DNASTAR Inc., Madison, Wis WI). Assim, durante a edição das sequências foram verificadas possíveis ambiguidades em decorrência de erros de leitura do sequenciamento. As sequências nucleotídicas consenso editadas foram alinhadas pelo algoritmo CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994) inserido no pacote do programa Bioedit (HALL, 1999). Para a análise de similaridade foi utilizado o servidor BLAST 2.0 (“Basic Local Alignment Search Tool”) (ALTSCHUL et al., 1997) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) da Biblioteca Nacional de Medicina do NIH (“National Institute of Health”), Maryland, EUA (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). As sequências dos gêneros, previamente depositadas no Genbank, foram alinhadas com as sequências obtidas neste estudo.

O alinhamento das sequências deste estudo com as sequências depositadas no Genbank serviu como base para a construção da árvore filogenética, utilizando o software MEGA versão 5.0 (TAMURA et al., 2011), sendo que a estimativa da distância utilizada foi o modelo Kimura 2 parâmetros, modelo que considera transições e transversões ocorrendo em taxas diferentes (KIMURA, 1980). As árvores filogenéticas foram construídas empregando o algoritmo de máxima verossimilhança (FELSENSTEIN, 1981) a veracidade dos ramos foi conferida por análise de “bootstrap” (1000 repetições).

2.4. Análises estatísticas

A prevalência, intensidade e abundância foram calculadas segundo os conceitos preconizados por Bush et al. (1997).

3. RESULTADOS

O estudo mostrou diferentes abundâncias de larvas de anisaquídeos em *P. numida*, *P. semifaciata* e *P. brasilianus*. Em *P. semifaciata* não foi encontrado nenhum anisaquídeo.

3.1. *Pseudoperca numida*

A prevalência de anisaquídeo foi de 88% (22 positivos de 25 hospedeiros analisados). A intensidade parasitária foi 1-19 e a abundância foi 0-78. Isso inclui 1 larva do gênero *Anisakis* e 77 larvas do gênero *Hysterothylacium*.

3.1.1. *Anisakis typica* (Diesing, 1860)

A análise morfológica das partes anterior e posterior do único espécime de *Anisakis* sp. mostrou uma larva de terceiro estágio, com três lábios poucos desenvolvidos (um ventral e dois ventrolaterais), dente cefálico presente e poro excretor localizado na base dos lábios ventrolaterais. A cauda é curta e arredondada com mucro terminal (Figura 4). As medidas estão incluídas na tabela I onde foram comparadas com outros *Anisakis* sp. encontrados na mesma localidade a partir de outros hospedeiros.

A parte mediana do corpo foi utilizada para análise molecular da subunidade II da citocromo oxidase (*cox-2* mtDNA). A construção da árvore filogenética com dados de *cox-2* mtDNA foi construída baseando-se no algoritmo de máxima verossimilhança entre a sequência de *Anisakis typica* obtida neste estudo (KF830019*) e sequências de *Anisakis* spp.

obtidas no GenBank. *Ascaris lumbricoides* foi utilizado como grupo externo (Figura 5). Os dados morfológicos e genéticos confirmaram a espécie *Anisakis typica*.

Local de infecção: estômago.

Prevalência: 4% (1/25).

Intensidade parasitária: 1-1

Abundância: 0-1

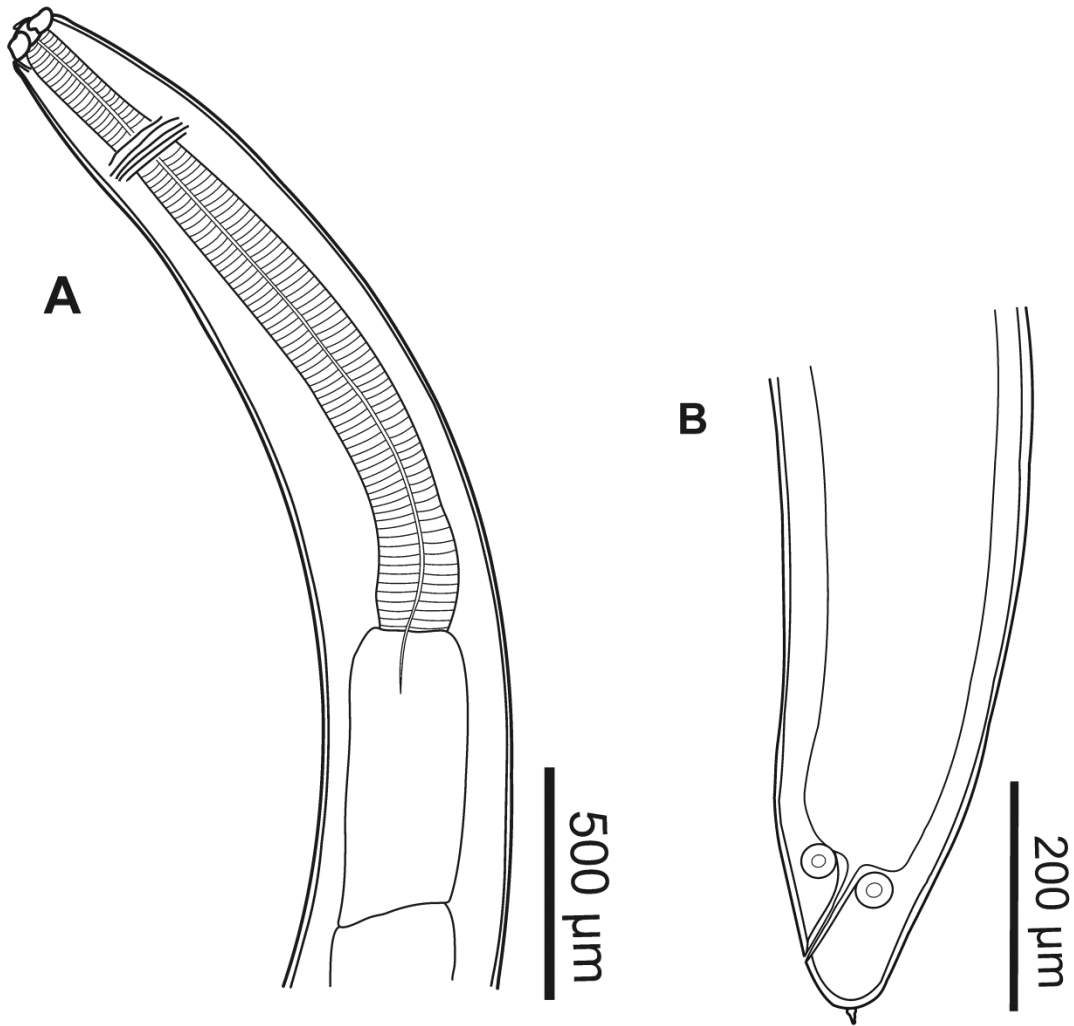


Figura 4. (A) Região anterior com dente larval e poro excretor próximo aos lábios e (B) região posterior com mucro terminal de *Anisakis typica* (vista ventral) em *Pseudopercis numida*.

Tabela 1. Comparação dos valores médios (mm) e amplitude de variação da morfometria de larvas de *Anisakis* spp. do litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil.

	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Anisakis typica</i>	<i>Anisakis</i> sp.	<i>Anisakis typica</i>
Referência	Bicudo et al. (2005)	Borges et al. (2012)	Saad et al. (2012)	Presente estudo (2014)
Hospedeiro	<i>Prionotus punctatus</i>	<i>Trichiurus lepturus</i>	<i>Lophius gastrophysus</i>	<i>Pseudopercis numida</i>
Comp. Corpo	6,17 (3,51–8,40)	19,31 (15,34–22,43)	20,21 (17,61– 26,49)	-
Larg. Corpo	0,16 (0,08–0,56)	0,45 (0,6–0,35)	0,57 (0,47– 0,68)	-
Comp. Esôfago	0,54 (0,34–0,74)	1,46 (1,81–1,1)	1,63 (1,06– 2,01)	1,52
Ventrículo	0,30 (0,12–0,37)	0,61 (0,76–0,5)	0,67 (0,57– 0,75)	0,62
Cauda	0,15 (0,12–0,19)	0,12 (0,2–0,08)	0,11 (0,09– 0,14)	0,09
Razão esôfago/ventrículo	-	1:0,30–0,54	-	1:0,41

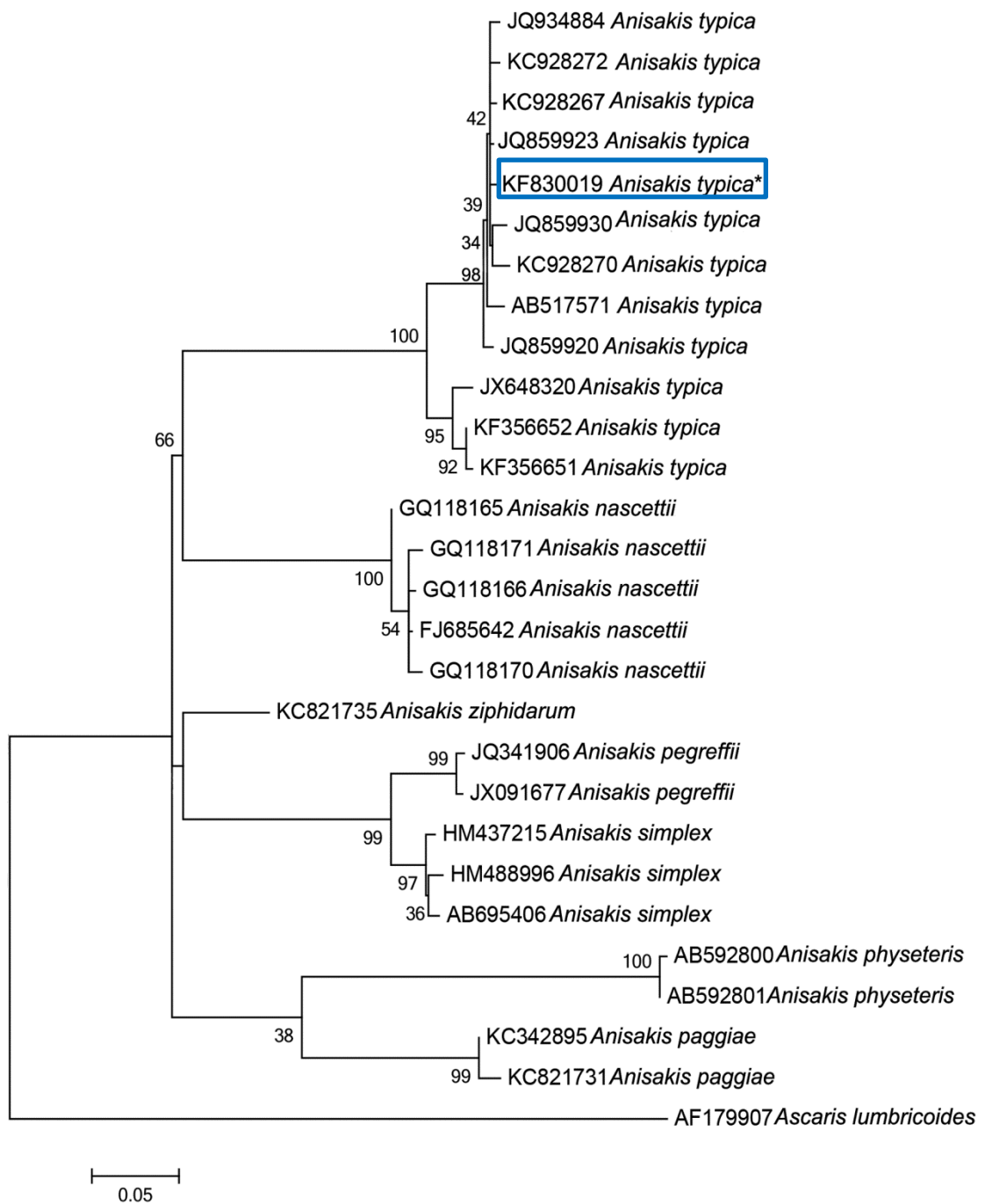


Figura 5. Árvore filogenética baseada no algoritmo de máxima verossimilhança entre a sequência de *Anisakis typica* obtida neste estudo (*) e sequências de espécies *Anisakis* spp. obtidas no GenBank a partir dados de *cox-2* mtDNA. Os números representam em porcentagem a confiabilidade dos resultados de parentesco obtidos “bootstrap”. *Ascaris lumbricoides* foi utilizado como grupo externo.

3.1.2. *Hysterothylacium* sp.

A análise morfológica do gênero *Hysterothylacium* foi feita baseando-se em 20 espécimes e mostrou pequenos nematoides com cutícula lisa e esbranquiçada. Lábios pouco desenvolvidos e poro excretor localizado próximo ao anel nervoso. Ceco curto. Cauda digitiforme com mucro terminal (Figura 6). As medidas estão incluídas na tabela II onde foram comparadas com outros *Hysterothylacium* sp. encontrados na mesma localidade a partir de outros hospedeiros.

Duas larvas foram utilizadas para análise molecular de *cox-2* mtDNA. Máxima verossimilhança entre sequências de *Hysterothylacium* obtidas neste estudo (KF830020* e KF830021*) e sequências de *Hysterothylacium* spp. obtidas no GenBank, com árvore filogenética construída a partir dados de *cox-2* mtDNA. *Cucullanus robustus* foi utilizado como grupo externo.

As sequências obtidas apresentaram alta similaridade com as sequências JF730211, JF730212, JF730213, JF730214 e JQ798965. Dois cladogramas foram observados entre sequências de mesma espécie utilizadas para a construção da árvore (*cox-2* mtDNA) (Figura 7).

Um espécime de *Hysterothylacium* sp. foi utilizado para análise molecular de ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA. Foi construída árvore filogenética baseado-se no algoritmo de máxima verossimilhança entre a sequência de *Hysterothylacium* sp. obtida neste estudo (KF830025*) e sequências de *Hysterothylacium* spp. obtidas no GenBank a partir dados de ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA. *Ascaris lumbricoides* foi utilizado como grupo externo. A sequência obtida neste estudo apresentou alta similaridade com JF730200, JQ798963, JF730203 e JF730204 (Figura 8).

Os dados morfológicos e genéticos não confirmaram a espécie devido a ausência de sequências similares de adultos depositadas no GenBank.

Locais de infecção: cavidade abdominal, estômago e intestino.

Prevalência: 88% (22/25).

Intensidade parasitária: 1-19

Abundância: 0-77

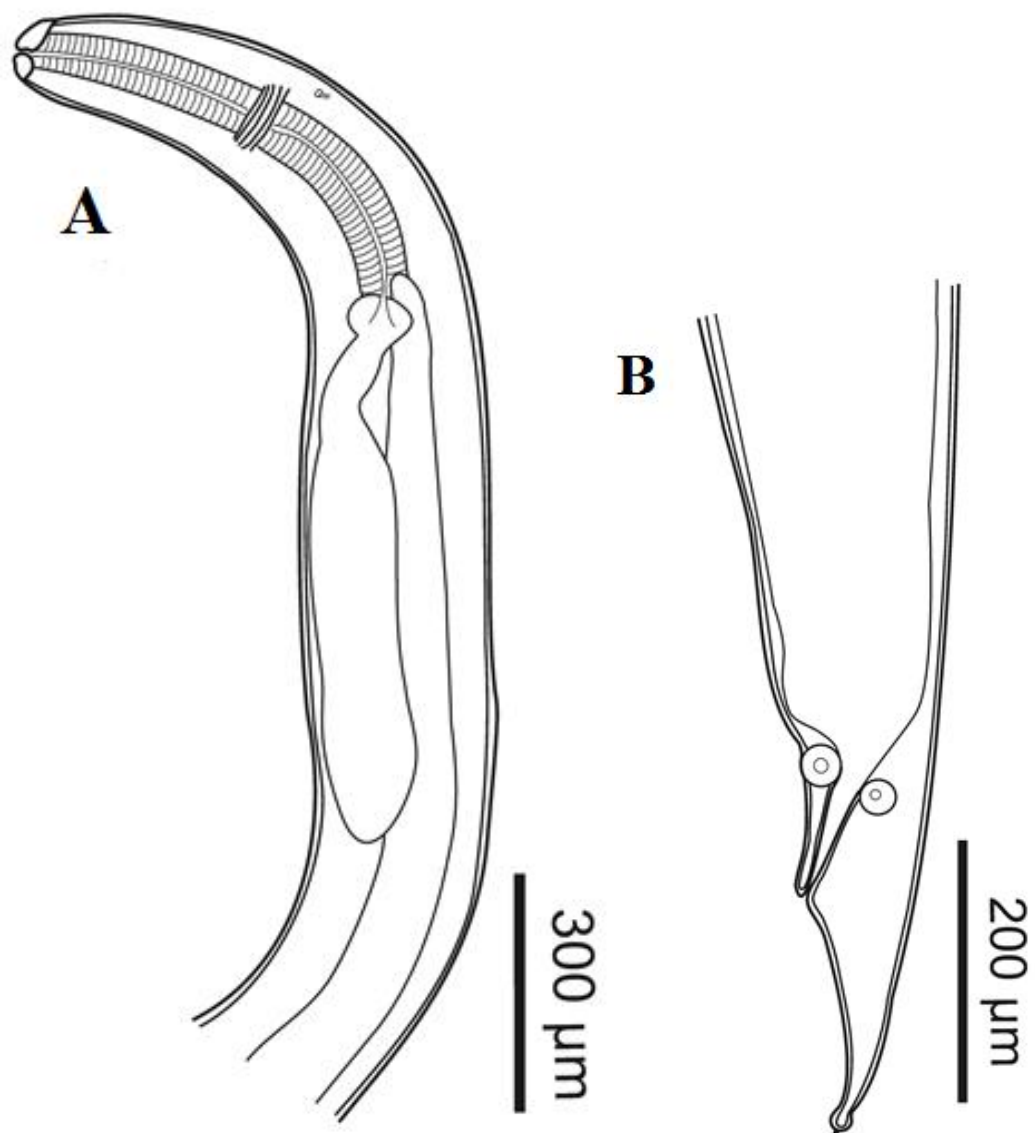


Figura 6. Região anterior com poro excretor próximo ao anel nervoso. Ceco curto (A) e região posterior com cauda digitiforme e mucro terminal (B) de *Hysterothylacium* sp. (vista ventral) em *Pseudopercis numida*.

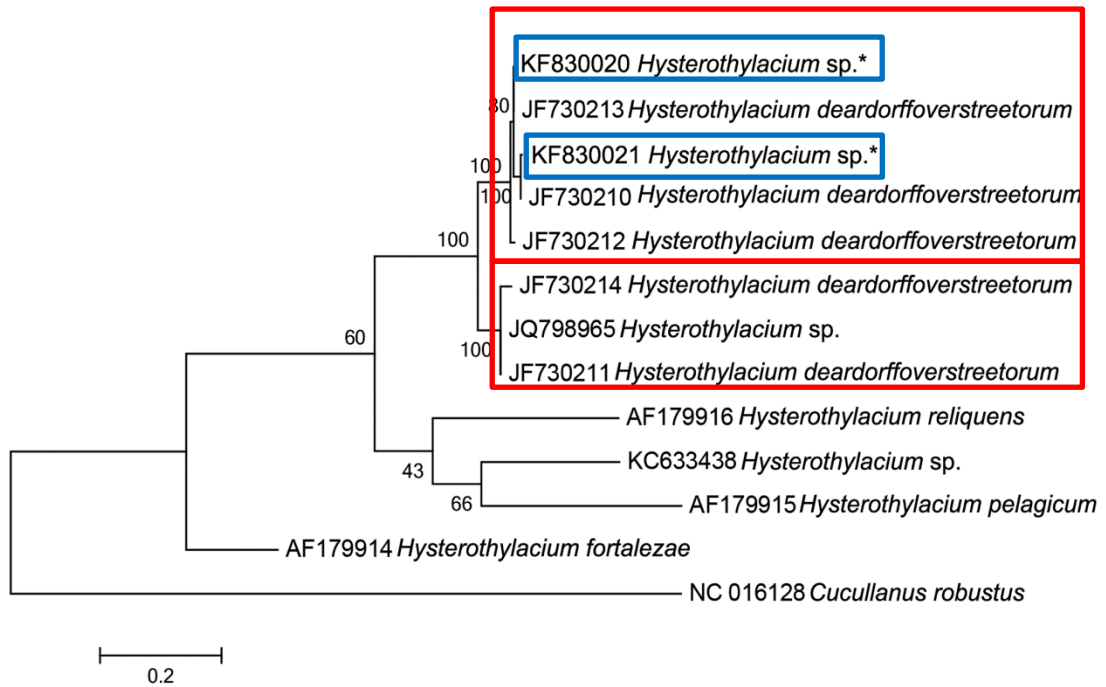


Figura 7. Árvore filogenética baseada no algoritmo de máxima verossimilhança entre sequências de *Hysterothylacium* sp. obtidas neste estudo (*) e sequências de *Hysterothylacium* spp. obtidas no GenBank a partir dados de *cox-2* mtDNA. Os números representam em porcentagem a confiabilidade dos resultados de parentesco obtidos “bootstrap”. *Cucullanus robustus* foi utilizado como grupo externo.

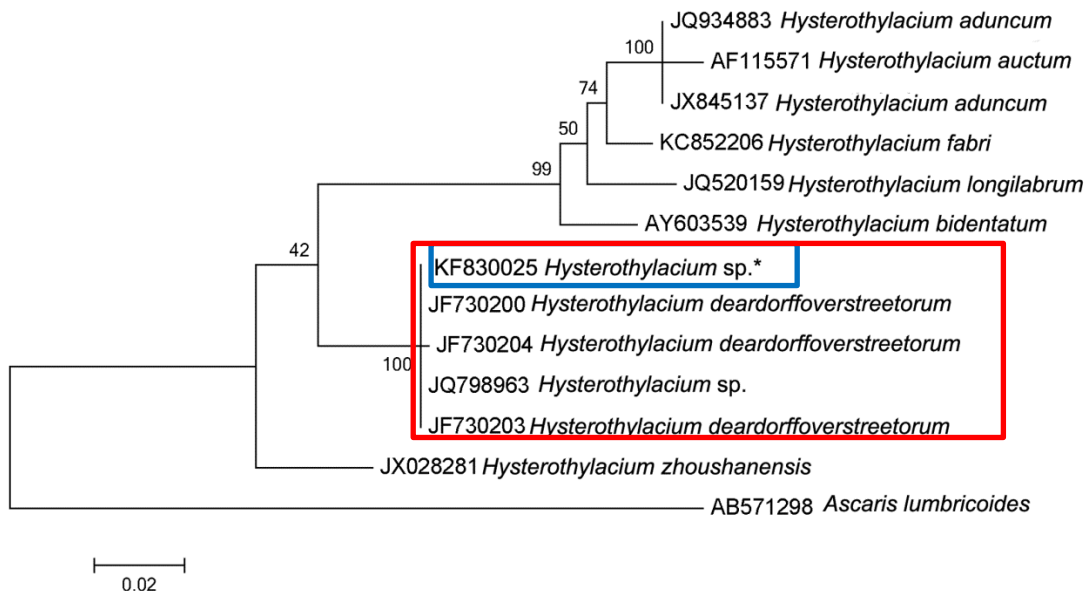


Figura 8. Árvore filogenética baseada no algoritmo de máxima verossimilhança entre sequências de *Hysterothylacium* sp. obtida neste estudo (*) e sequências de *Hysterothylacium* spp. obtidas no GenBank a partir de dados de ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA. Os números representam em porcentagem a confiabilidade dos resultados de parentesco obtidos “bootstrap”. *Ascaris lumbricoides* foi utilizado como grupo externo.

3.2. *Pinguipes brasilianus*

A prevalência de anisaquídeo foi de 100% (25 positivos de 25 hospedeiros analisados). A intensidade parasitária foi 1-57 e a abundância foi 0-274. Isso inclui 267 larvas do gênero *Hysterothylacium* e 7 larvas do gênero *Raphidascaris*.

3.2.1. *Hysterothylacium* sp.

A análise morfológica do gênero *Hysterothylacium* foi feita baseando-se em 20 espécimes, e mostrou pequenos nematoides com cutícula lisa e esbranquiçada. Lábios pouco desenvolvidos e poro excretor localizado próximo ao anel nervoso. Ceco curto. Cauda digitiforme com mucro terminal (Figura 9). As medidas estão incluídas na tabela II onde foram comparadas com outros *Hysterothylacium* sp. encontrados na mesma localidade a partir de outros hospedeiros. A análise molecular da larva de *Hysterothylacium* sp. em *P. brasilianus* não foi possível, pois o produto sequenciado não obteve boa qualidade.

Locais de infecção: cavidade abdominal, estômago e intestino.

Prevalência: 100% (25/25).

Intensidade parasitária: 1- 57

Abundância: 0-267

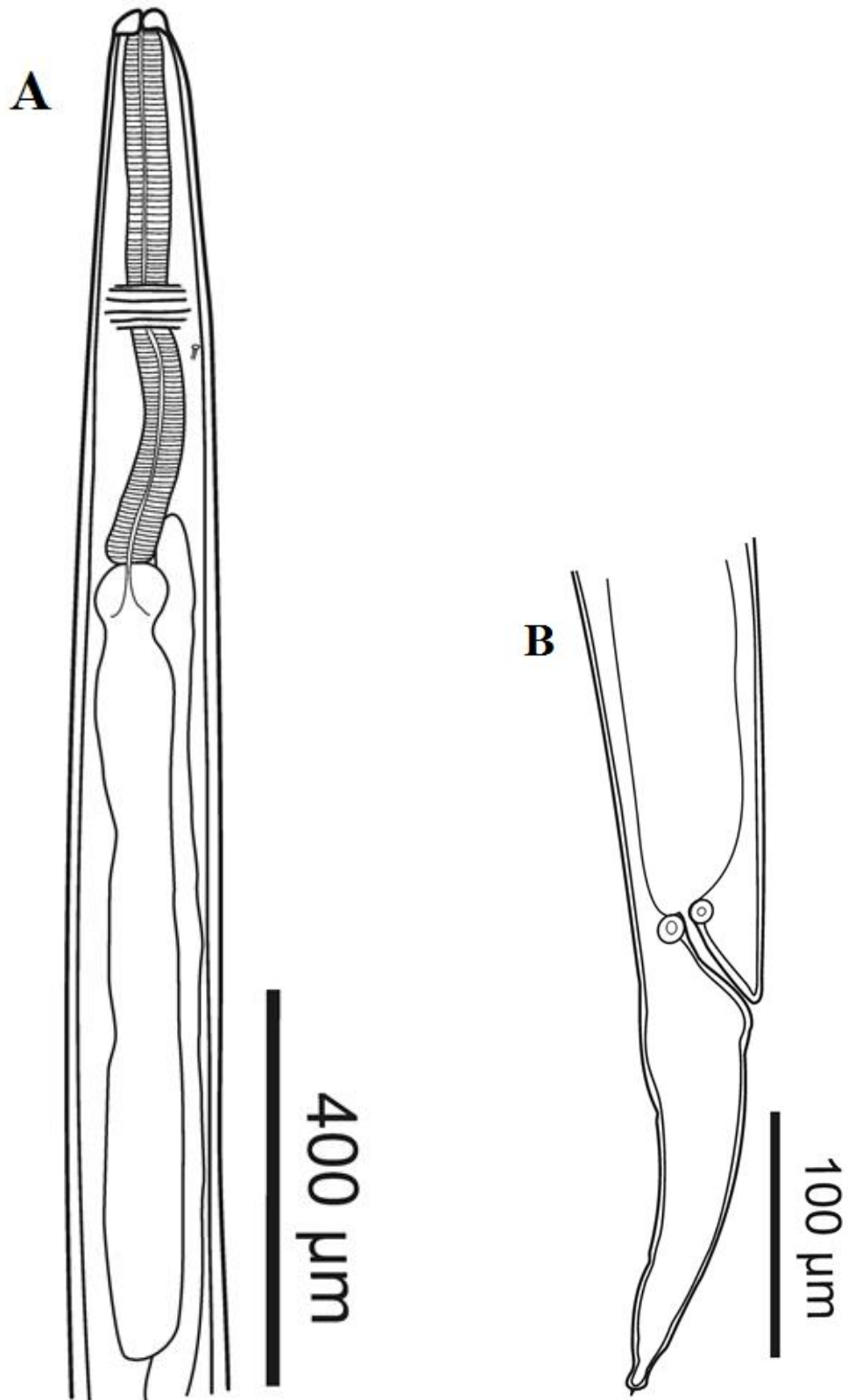


Figura 9 – Região anterior com poro excretor próximo ao anel nervoso. Ceco curto (A) e região posterior com cauda do tipo digitiforme e mucro terminal (B) de *Hysterothylacium* sp. (vista ventral) em *Pinguipes brasiliensis*.

3.2.2. *Raphidascaris* sp.

A análise morfológica das larvas de *Raphidascaris* sp. foi feita baseando-se em 5 espécimes e mostrou pequenos nematoides com cutícula lisa e esbranquiçada. Lábios pouco desenvolvidos com dente cefálico presente. Poro excretor localizado posterior ao anel nervoso. Apêndice ventricular presente e cauda afunilada com finas estriações (Figura 10). As medidas estão incluídas na tabela III onde foram comparadas com outros *Raphidascaris* sp. encontrados na mesma localidade a partir de outros hospedeiros.

Dois espécimes de *Raphidascaris* sp. foram utilizados para análise molecular. A árvore filogenética foi construída baseando-se no algoritmo de máxima verossimilhança entre as sequências de *Raphidascaris* sp. obtidas neste estudo (KJ634266* e KJ634267*) e sequências de *Raphidascaris* spp. obtidas no GenBank a partir de dados de ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA. *Hysterothylacium aduncum* foi usado como grupo externo (Figura 11). As sequências obtidas neste estudo apresentaram similaridade entre si e não apresentaram alta similaridade com nenhuma espécie do gênero depositada no GenBank. Os dados morfológicos e moleculares não confirmaram a espécie devido à ausência de sequência de adultos no GenBank.

Local de infecção: intestino.

Prevalência: 20% (5/25).

Intensidade parasitária: 1-2

Abundância: 0-7

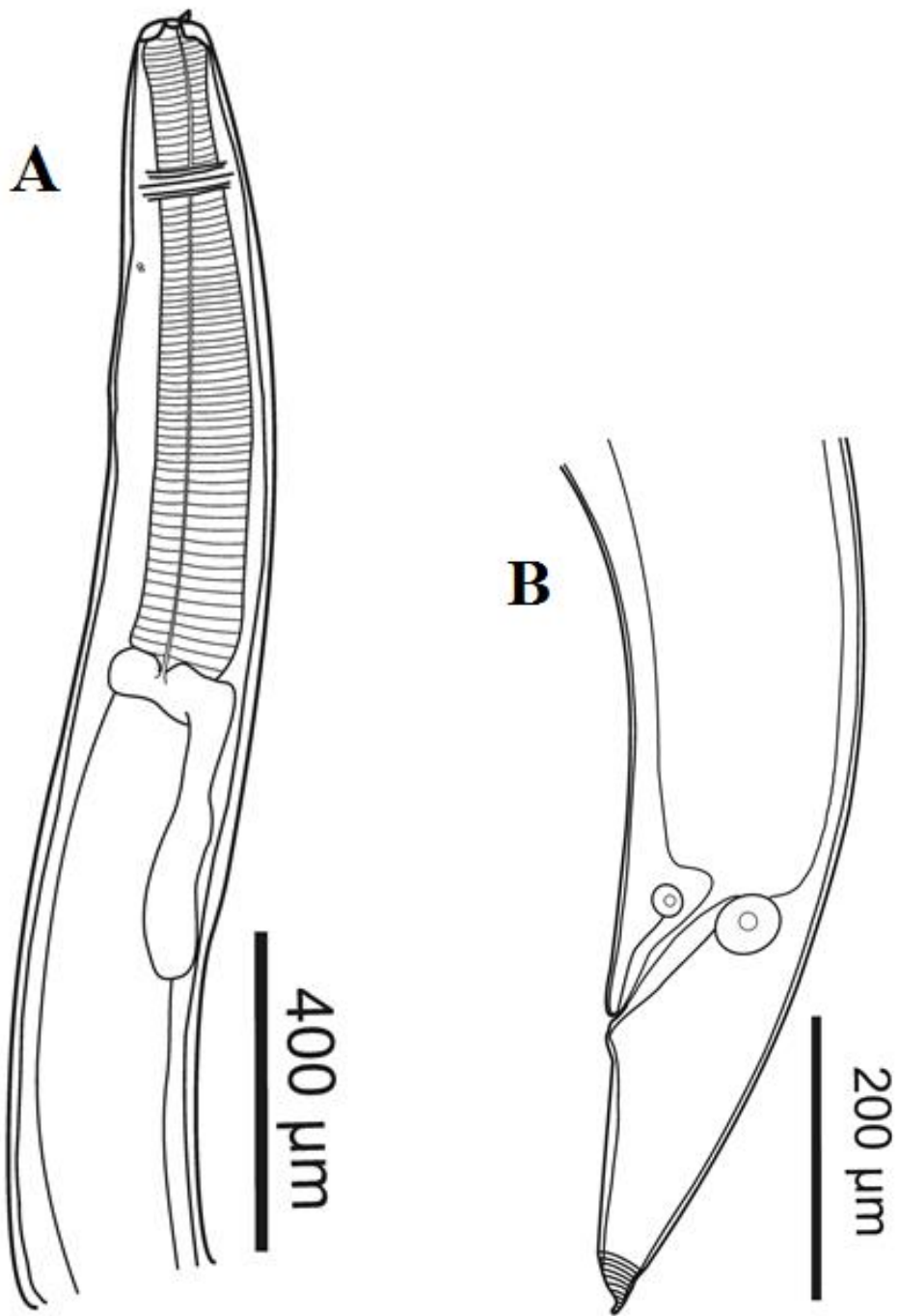


Figura 10. Região anterior com dente larval bem visível e poro excretor localizado após o anel nervoso (A) e região posterior com finas estriações (B) de *Raphidascaaris* sp. (vista ventral) em *Pinguipes brasilianus*.

Tabela 2. Comparação dos valores médios (mm) amplitude de variação da morfometria de larvas *Raphidascaris* sp. relatadas no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Referência	<i>Raphidascaris</i> sp. Bicudo et al. (2005)	<i>Raphidascaris</i> sp. Felizardo et al. (2009)	<i>Raphidascaris</i> sp. Saad et al. (2012)	<i>Raphidascaris</i> sp. Presente estudo
Hospedeiros	<i>Prionotus punctatus</i>	<i>Paralichthys isosceles</i>	<i>Lophius gastrophysus</i>	<i>Pinguipes brasilianus</i>
Corpo (Comp)	8,12 (3,94 – 12,05)	9,17 (6,85–11,5)	8,35 (6,45–9,86)	8,25 (8,72–7,23)
Corpo (Larg)	0,29 (0,14 – 0,35)	29,5 (0,28–0,31)	0,36 (0,26–0,47)	0,23 (0,29–0,20)
Esôfago (Comp)	0,92 (0,65 – 1,09)	0,85 (0,57–0,93)	0,80 (0,58–0,97)	0,86 (0,90–0,80)
Ventrículo	0,06 (0,03 – 0,09)	0,12 (0,08–0,15)	0,06 (0,05–0,07)	0,06 (0,07–0,05)
Apêndice ventricular	0,42 (0,15 – 0,72)	0,48 (0,28–0,80)	0,44 (0,27–0,53)	0,43 (0,50–0,40)
Cauda	0,32 (0,22 – 0,41)	0,25 (0,13–0,34)	0,20 (0,12–0,33)	0,26 (0,30–0,21)
Esôfago/ventrículo	-	-	-	1: 0,07 (0,07–0,08)
Esôfago/Apêndice ventricular	-	-	-	1: 0,51 (0,48 – 0,55)

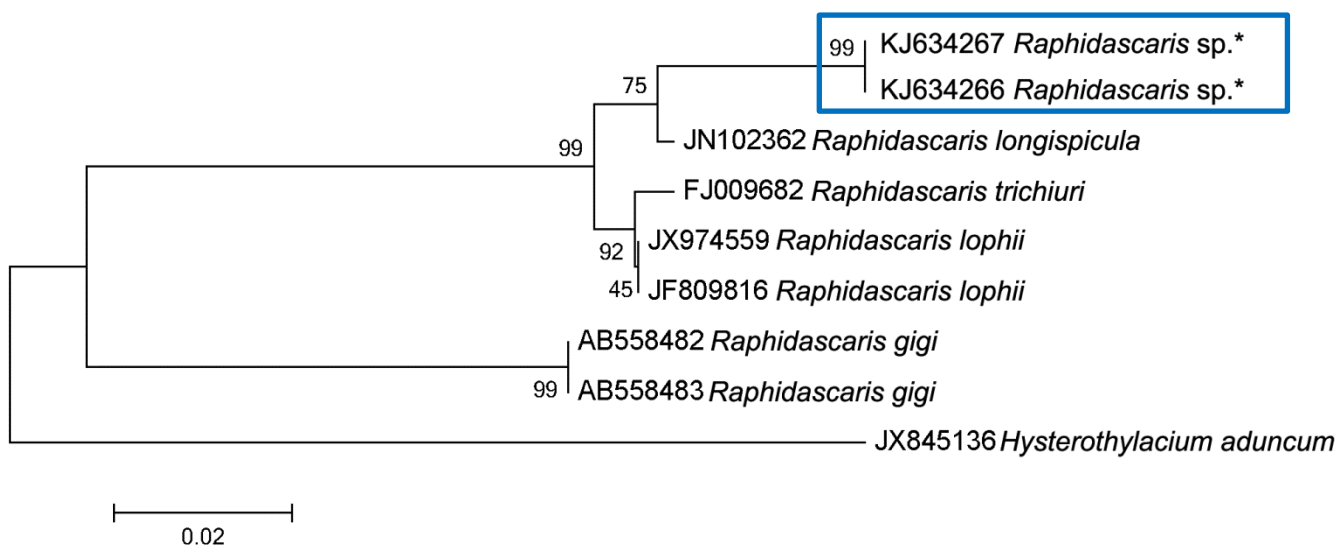


Figura 11. Árvore filogenética baseada no algoritmo de máxima verossimilhança entre sequências de *Raphidascares* sp. obtidas neste estudo (*) e sequências de *Raphidascares* spp. obtidas no GenBank a partir dados de ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA. Os números representam em porcentagem a confiabilidade dos resultados de parentesco obtidos “bootstrap”. *Hysterothylacium aduncum* foi utilizado como grupo externo.

As sequências parciais nucleotídicas obtidas no presente estudo e sequências de espécies utilizadas para comparação e construção das árvores filogenéticas a partir de *cox-2* mtDNA e ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA estão disponíveis na tabela 4.

Tabela 3. Comparação dos valores médios (mm) e amplitude de variação da morfometria de larvas de *Hysterothylacium* sp. relatadas no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Referência	<i>Hysterothylacium</i>				Presente estudo	<i>Hysterothylacium</i> sp. <i>Pinguipes brasiliensis</i>
	<i>Hysterothylacium</i> sp. Bicudo et al. (2005)	<i>Hysterothylacium</i> sp. Saad et al. (2012)	<i>Hysterothylacium</i> sp. deardorffoverstreetorum Knoff et al. (2012)	<i>Hysterothylacium</i> sp. Borges et al. (2012)		
Hospedeiros	<i>Prionotus punctatus</i>	<i>Lophius gastrophysus</i>	<i>Paralichthys isosceles</i>	<i>Trichiurus lepturus</i>	<i>Pseudoperca numida</i>	<i>Pinguipes brasiliensis</i>
Comp. Corpo	14,99 (2,97-23,13)	5,78 (4,44-7,13)	10,1 (3,62-16,7)	7,84 (3,42-14,8)	7,62 (7,42-7,94)	3,90 (3,50-4,41)
Larg. Corpo	0,35 (0,08-0,56)	0,20 (0,14-0,26)	0,25 (0,11-0,40)	0,24 (0,13-0,40)	0,27 (0,24-0,30)	0,10 (0,10-0,11)
Comp. Esôfago	0,93 (0,40-1,25)	0,45 (0,35-0,56)	0,69 (0,23-1,16)	0,64 (0,41-0,87)	0,67 (0,60-0,74)	0,40 (0,37-0,44)
Ventrículo	0,11 (0,04-0,15)	0,05 (0,04-0,06)	0,10 (0,05-0,15)	0,07 (0,04-0,1)	0,09 (0,08-0,10)	0,05 (0,04-0,06)
Apêndice ventricular	0,58 (0,15-1,16)	0,34 (0,33-0,35)	0,86 (0,35-1,37)	0,59 (0,31-0,84)	0,89 (0,80-0,93)	0,53 (0,50-0,58)
Ceco intestinal	0,40 (0,14-0,56)	0,05 (0,05-0,06)	0,18 (0,05-0,32)	0,16 (0,1-0,46)	0,17 (0,14-0,19)	0,08 (0,08-0,09)
Cauda	0,31 (0,12-0,47)	0,13 (0,13-0,13)	0,20 (0,10-0,32)	0,16 (0,11-0,22)	0,21 (0,19-0,24)	0,14 (0,13-0,15)
Esôfago/Ventrículo	-	-	-	1:0, 07-0, 20	1:0,14 (0,12-0,16)	1:0, 13 (0, 10-0,15)
Esôfago/Ceco intestinal	2,38 (1,67-3,13)	-	-	1:0, 14-0, 34	1:0, 24 (0,21-0,28)	1:0,21 (0, 19-0, 22)
Esôfago/Apêndice ventricular	1,72 (1,0-2,61)	-	-	1:0, 60-1, 33	1:0, 79 (0, 66-0, 87) *	1:0,75 (0, 66-0, 89)*

*Relação Apêndice ventricular/Esôfago

Tabela 4. Lista das espécies de anisacídeos encontrados no atual estudo e espécies depositadas no GenBank utilizadas para comparação e construção das árvores filogenéticas a partir de dados de *cox-2* mtDNA e ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA.

Região	Espécies	Nº acesso GenBank	Referência	
ITS	<i>Hysterothylacium auctum</i>	AF115571	Szostakowska et al. (2001)	
	<i>Hysterothylacium aduncum</i>	JQ934883	Vardic Smrzlic et al. (2012)	
	<i>H. aduncum</i>	JX845136	Não publicado	
	<i>H. aduncum</i>	JX845137	Não publicado	
	<i>Hysterothylacium fabri</i>	KC852206	Pekmezci et al. (2014)	
	<i>Hysterothylacium longilabrum</i>	JQ520159	Li et al. (2012)	
	<i>Hysterothylacium bidentatum</i>	AY603539	Não publicado	
	<i>Hysterothylacium deardorffoverstreeterum</i>	JF730200	Knoff et al. (2012)	
	<i>H. deardorffoverstreeterum</i>	JF730204	Knoff et al. (2012)	
	<i>H. deardorffoverstreeterum</i>	JF730203	Knoff et al. (2012)	
	<i>Hysterothylacium</i> sp.	JQ798963	Borges et al. (2012)	
	<i>Hysterothylacium zhoushanensis</i>	JX028281	Li et al. (2012)	
	<i>Hysterothylacium</i> sp.	KF830025	Presente estudo	
	<i>Raphidascaris longispicula</i>	JN102362	Li et al. (2012)	
	<i>Raphidascaris trichiurii</i>	FJ009682	Damin & Heqing (2001)	
	<i>Raphidascaris lophii</i>	JX974559	Kim et al. (2012)	
	<i>R. lophii</i>	JF809816	Xu et al. (2012)	
	<i>Raphidascaris gigi</i>	AB558482	Abe (2011)	
	<i>R. gigi</i>	AB558483	Abe (2011)	
	<i>Raphidascaris</i> sp.	KJ634266	Presente estudo	
	<i>Raphidascaris</i> sp.	KJ634267	Presente estudo	
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	AB571298	Arizono et al. (2010)	
	Cox-2	<i>Hysterothylacium deardorffoverstreeterum</i>	JF730213	Knoff et al. (2012)
		<i>H. deardorffoverstreeterum</i>	JF730210	Knoff et al. (2012)
		<i>H. deardorffoverstreeterum</i>	JF730212	Knoff et al. (2012)
		<i>H. deardorffoverstreeterum</i>	JF730214	Knoff et al. (2012)
		<i>H. deardorffoverstreeterum</i>	JF730211	Knoff et al. (2012)
		<i>Hysterothylacium</i> sp.	JQ798965	Borges et al. (2012)
		<i>Hysterothylacium reliquens</i>	AF179916	Nadler e Hudspeth (2000)
		<i>Hysterothylacium</i> sp.	KC633438	Não publicado
<i>Hysterothylacium pelagicum</i>		AF179915	Nadler e Hudspeth (2000)	
<i>Hysterothylacium fortalezae</i>		AF179914	Nadler e Hudspeth (2000)	
<i>Hysterothylacium</i> sp.		KF830020	Presente estudo	
<i>Hysterothylacium</i> sp.		KF830021	Presente estudo	
<i>Cucullanus robustos</i>		NC016128	Park et al. (2011)	
<i>Anisakis typica</i>		JQ934884	Smrzlic et al. (2012)	
<i>A. typica</i>		KC928272	Anshary et al. (2014)	
<i>A. typica</i>		KC928267	Anshary et al. (2014)	
<i>A. typica</i>		JQ859923	Não publicado	

<i>A. typica</i>	KF830019	Presente estudo
<i>A. typica</i>	JQ859930	Não publicado
<i>A. typica</i>	KC928270	Anshary et al. (2014)
<i>A. typica</i>	AB517571	Suzuki et al. (2009)
<i>A. typica</i>	JQ859920	Não publicado
<i>A. typica</i>	JX648320	Koinari et al. (2013)
<i>A. typica</i>	KF356651	Não publicado
<i>A. typica</i>	KF356652	Não publicado
<i>Anisakis nascettii</i>	GQ118165	Mattiucci et al. (2009)
<i>A. nascettii</i>	GQ118171	Mattiucci et al. (2009)
<i>A. nascettii</i>	GQ118166	Mattiucci et al. (2009)
<i>A. nascettii</i>	FJ685642	Mattiucci et al. (2009)
<i>A. nascettii</i>	GQ118170	Mattiucci et al. (2009)
<i>Anisakis ziphidarum</i>	KC821735	Quiazon et al. (2013)
<i>Anisakis pegreffii</i>	JQ341906	Mladineo et al. (2012)
<i>A. pegreffii</i>	JX091677	Não publicado
<i>Anisakis simplex</i>	HM437215	Não publicado
<i>A. simplex</i>	HM488996	Setyobudi et al. (2011)
<i>A. simplex</i>	AB695406	Não publicado
<i>Anisakis physeteris</i>	AB592800	Murata et al. 2011
<i>A. physeteris</i>	AB592801	Murata et al. 2011
<i>Anisakis paggiae</i>	KC342895	Quiazon et al. (2013)
<i>A. paggiae</i>	KC821731	Quiazon et al. (2013)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	AF179907	Nadler e Hudspeth (2000)

4. DISCUSSÃO

Pseudopercis numida, *P. semifasciata* e *P. brasiliensis* são espécies propensas a infecções de larvas de anisquídeos, pois a análise do conteúdo estomacal revelou que a dieta destes peixes inclui variedade de outros peixes, crustáceos e moluscos que desempenham um papel importante no ciclo de vida desses parasitos.

Não foi possível avaliar um padrão de anisquídeos entre os diferentes hospedeiros, pois os espécimes não foram coletados na mesma época do ano devido à dificuldade de obtenção destes peixes. Os gêneros de anisquídeos encontrados no atual estudo já haviam sido relatados anteriormente, porém diferente dos trabalhos já realizados, aqui foi abordada juntamente a morfologia e genética destas larvas.

Devido à abundância de anisquídeos em peixes de importância comercial e as implicações em saúde pública, um enorme número de registros de *Anisakis* Dujardin, 1845, vem sendo acumulado na literatura, no entanto, grande parte dos resultados é apenas de identificação morfológica (KUHN et al., 2013). No litoral do Estado do Rio de Janeiro larvas de *Anisakis* sp. tem sido reportadas em 20 espécies de peixes pertencentes a diversas famílias (TAVARES; LUQUE, 2006; SAAD et al., 2012; FONTENELLE et al., 2013), porém, até o momento, foram feitos poucos estudos que confirmem as espécies que ocorrem no Brasil. Muitos trabalhos realizados no país apenas de cunho morfológico enfatizam a questão zoonótica relacionada a este gênero, porém, de fato, não se tem certeza em relação à identidade específica do parasito para tal ênfase. Klimpel e Palm (2011) sugerem que nem todas as espécies do gênero *Anisakis* são perigosas para seres humanos. Neste sentido, a

análise molecular mostra ser uma ferramenta de extrema importância para a diagnose deste gênero. E a partir da obtenção da identidade específica tomar as medidas necessárias em termos de saúde pública.

Atualmente, o gênero *Anisakis* é composto por 9 espécies divididas dois grandes cladogramas. No Brasil, até o momento, quatro espécies deste total foram relatadas através de metodologias moleculares, *A. physeteris* Baylis, 1923, *A. typica* (Diesing, 1860), *A. nascettii* Mattiucci, Paoletti & Webb, 2009 e *A. paggiae* Mattiucci, Nascetti, Dailey, Webb, Barros, Cianchi & Bullini, 2005 (MATTIUCCI et al., 2002; IÑIGUEZ et al., 2009, 2011; BORGES et al., 2012; DI AZEVEDO et al., 2014, 2015). A sequência de *Anisakis* sp. encontrada em *P. numida* mostrou alta similaridade com sequências de *A. typica* depositadas no GenBank com a árvore inferida a partir de dados de *cox-2* mtDNA. Estudos recentes mostram que *cox-2* é um marcador confiável para distinguir espécies de *Anisakis* (MATTIUCCI et al., 2009). Deste modo, a análise morfológica juntamente com a molecular permitiu a identificação específica com confiabilidade, sendo este o primeiro registro de *A. typica* em *P. numida*.

De acordo com Xu et al. (2014), existem 71 espécies do gênero *Hysterothylacium* registradas no mundo. No Brasil ocorrem três espécies, *H. fortalezae* Klein, 1973, *H. reliquens* Norris & Overstreet 1975 e *H. deardorffoverstreetorum* Knoff, Felizardo, Iniguez, Torres, Pinto & Gomes, 2012 (DEARDORFF; OVERSTREET, 1980; KNOFF et al., 2012). No litoral do Estado do Rio de Janeiro já foram reportadas larvas deste gênero em 28 peixes (TAVARES; LUQUE, 2006), porém, até o momento, apenas dois estudos foram feitos de cunho molecular (KNOFF et al., 2012; BORGES et al., 2012).

A análise molecular deste gênero é importante, pois espécies do gênero *Hysterothylacium* são facilmente confundidas com espécies do gênero *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912, especialmente em estádios larvais, com base na morfologia do trato gastrointestinal, pois ambos os gêneros possuem ceco intestinal e apêndice ventricular. No entanto, em *Hysterothylacium* o poro excretor é localizado próximo ao anel nervoso e em *Contracaecum* o poro excretor é localizado próximo ao lábio ventral (DEARDORFF; OVERSTREET, 1980, 1981; MORAVEC, 1998). De acordo com Shamsi et al. (2013), a identificação até mesmo em nível de gênero de estádios larvais de *Hysterothylacium* usando apenas dados morfológicos é difícil, pois outros gêneros, assim como *Hysterothylacium*, possuem ceco intestinal, ventrículo e poro excretor no nível do anel nervoso, como por exemplo, *Paraheterotyphlum* Johnston & Mawson, 1948, *Heterotyphlum* Spaul, 1927, *Iheringascaris* Pereira, 1935 e *Lappetascaris* Rasheed, 1965. No presente estudo a análise filogenética mostrou a proximidade das larvas encontradas com sequências de *Hysterothylacium* spp. depositadas no GenBank.

A análise molecular da larva de *Hysterothylacium* sp. em *P. numida* mostrou uma similaridade significativa com *H. deardorffoverstreetorum*, mostrando provavelmente ser a mesma espécie. Porém, *H. deardorffoverstreetorum* foi descrita a partir da caracterização morfológica de estádios larvais e dados moleculares. Sendo assim, não temos a certeza que esta é uma espécie válida, pois a caracterização morfológica e molecular das formas adultas não foi considerada na descrição. Essa incerteza reforça a ideia de que dados moleculares devem ser acompanhados de fortes evidências morfológicas baseadas nos espécimes adultos (BORGES et al., 2012).

Se todas as espécies conhecidas do gênero *Hysterothylacium* obtivessem dados moleculares dos adultos depositadas no GenBank e sequências das larvas de *H. deardorffoverstreetorum* não mostrasse alta similaridade com nenhuma delas, haveria indícios de uma nova espécie. Porém, dentre todas as espécies conhecidas do gênero *Hysterothylacium*, são poucas as que possuem sequências das formas adultas depositadas no GenBank. Deste modo, muitas larvas sequenciadas deste gênero não podem ser identificadas

especificamente, e por essa razão que a descrição de *H. deardorffoverstreetorum* gera dúvidas.

Estudos mais recentes sugerem que para estudos taxonômicos a integração de ferramentas morfológicas e moleculares pode alcançar máxima eficiência para correta identificação ou clara detecção de nematoides ascaridídeos (MATTIUCCI et al., 2008, 2010; GARBIN et al., 2011; D'AMELIO et al., 2012; BORGES et al. 2012; XU et al., 2012; SHAMSI et al., 2013).

A similaridade entre as sequências de DNA de *Hysterothylacium* sp. obtidas no presente estudo (KF830020 e KF830021) na região *cox-2* foi bem suportada com *H. deardorffoverstreetorum* (JF730211, JF730212, JF730213, JF730214). Do contrário, nossos *Hysterothylacium* sp. (KF830020 e KF830021) apresentaram-se em clados diferentes com as sequências JF730211 e JF730214 que também são sequências *H. deardorffoverstreetorum*. Essa diferença também foi observada por Borges et al. (2012) entre as sequências e de *H. deardorffoverstreetorum* e *Hysterothylacium* sp. em *Trichiurus lepturus* em análise de mtDNA. Outra sequência deste estudo para ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA (KF830025) mostrou alta similaridade com *H. deardorffoverstreetorum* (JF730200, JF730202 e JF30203) com clados filogenéticos bem suportados.

Diante a forma como foi descrito *H. deardorffoverstreetorum* e dos diferentes clados observados na árvore filogenética (*cox-2* mtDNA) com sequências de mesmo nome, o presente estudo manteve a identificação de *Hysterothylacium* em nível de gênero em *P. numida*. Os dados moleculares (exemplo: ITS do rDNA, *cox-1* e *cox-2* do mtDNA) de todos os adultos descritos de nematoides ascaridídeos irá contribuir para resolver o problema (GUO et al., 2014), particularmente o estudo morfológico e genético dos adultos de *H. deardorffoverstreetorum* irá clarificar a sua classificação.

De acordo com Vicente et al. (1985) são reportadas 4 espécies do gênero *Raphidascaaris* parasitando peixes marinhos no Brasil, *R. acus*, *R. atlanticus*, *R. yamagutii* e *R. vicentei*. No entanto, Smith (1984) considera *A. atlanticus* e *R. yamagutii* sinônimos de *R. vicentei*. Tavares e Luque (2006) relataram a ocorrência do parasitismo por *Raphidascaaris* sp. em 31 espécies de peixes no litoral do Estado do Rio de Janeiro. As larvas encontradas neste estudo são morfológicamente semelhantes com as descritas por Bicudo et al. (2005) e Saad et al. (2012). A análise filogenética mostrou proximidade entre as sequências das larvas obtidas neste estudo com sequências de *Raphidascaaris* spp. depositadas no GenBank. Duas sequências para ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA (KJ634267 e KJ634266) mostraram alta similaridade entre si e estão bem suportadas em um clado distinto, não apresentando alta similaridade com nenhuma outra sequência de espécie do gênero utilizada para a construção da árvore. Assim como *Hysterothylacium* sp. a identificação de *Raphidascaaris* sp. manteve-se em nível de gênero, caracterizando apenas morfotipo.

Nossos resultados mostraram que atualmente o conhecimento sobre os anisquídeos no Brasil é bastante limitado. Estudos moleculares de anisquídeos adultos devem ser realizados a fim de esclarecer e elucidar a identidade das larvas obtendo mais informações relacionadas a esta família de nematoides no nosso litoral.

CAPÍTULO II –

DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE LARVAS DE *Hysterothylacium* spp. (ASCARIDOIDEA: ANISAKIDAE) EM 10 ESPÉCIES DE PEIXES NO LITORAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

RESUMO

Larvas de *Hysterothylacium* spp. parasitos de 10 espécies de peixes coletados em Cabo Frio (23° S, 42° W), Rio de Janeiro, Brasil, foram caracterizados morfolologicamente e geneticamente. Quatro diferentes morfotipos de larvas foram encontrados, apresentando três genótipos diferentes. Clados diferentes foram observados entre as sequências de *Hysterothylacium* morfotipos I e II, *H. deardorffoverstreetorum* e *Hysterothylacium* sp. em análise de *cox-2* mtDNA. Não foi possível identificar especificamente nenhum morfotipo de larva devido a ausência de sequências similares de adultos depositadas no GenBank. Larvas de *Hysterothylacium* sp. foram reportadas pela primeira vez em *Caulolatilus chrysops*, *Mullus argentinae*, *Priacanthus arenatus*, *Sarda sarda*, *Gymnothorax vicinus* e *Zenopsis conchifer* no litoral do Estado do Rio de Janeiro.

ABSTRACT

Larvae of *Hysterothylacium* spp. parasites in 10 hosts collected in Cabo Frio (23° S, 42° W), State of Rio de Janeiro, Brazil, were characterized morphologically and genetically. Four different morphotypes larvae were found, with three different genotypes. Different clades were observed among sequences in the morphotypes I and II, *H. deardorffoverstreetorum* and *Hysterothylacium* sp. in *cox-2* mtDNA analysis. It was not possible to identify any particular morphotype larvae due to the absence of similar adults sequences deposited in GenBank. Larvae *Hysterothylacium* sp. were reported in the first time in *Caulolatilus chrysops*, *Mullus argentinae*, *Priacanthus arenatus*, *Sarda sarda*, *Gymnothorax vicinus* and *Zenopsis conchifer* on the coast of Rio de Janeiro State.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior litoral do Oceano Atlântico Sul, com aproximadamente 8.500 km de extensão. É o país com a maior biodiversidade na região, com 1235 espécies de peixes marinhos conhecidas atualmente (LUQUE; POULIN, 2007; FROESE; PAULY, 2014).

A costa brasileira possui uma grande diversidade de características geológicas, geográficas, climáticas, hidrográficas e sedimentológicas que constituem uma grande diversidade de ambientes, dividida em cinco regiões. O Rio de Janeiro encontra-se em duas destas regiões, a Leste (da baía de Todos os Santos ao cabo de São Tomé (22° S), no Rio de Janeiro) e Sudeste (do cabo de São Tomé, ao cabo de Santa Marta (28° 40' S), em Santa Catarina) (MMA/IBAMA/DBFLO/CGFAP, 2007; EKAU; KNOPPERS, 1999). Por sua situação biogeográfica, o Rio de Janeiro tende a apresentar comunidades de peixes ricas em espécies. Este potencial é ampliado pela heterogeneidade de ambientes que ocorrem ao longo da costa fluminense (BIZERRIL; COSTA, 2001).

O Estado possui a terceira maior costa pesqueira do país (cerca de 635 km de extensão) e sua produção anual de pescados provenientes da pesca marinha é de cerca de 66 mil toneladas, o que lhe confere o 3º lugar no *ranking* nacional (MMA/IBAMA/DBFLO/CGFAP, 2007).

Diante tamanha diversidade de peixes e importância econômica, estudos relacionados à parasitofauna destes vertebrados marinhos no litoral do Rio de Janeiro ainda são escassos na literatura. Parasitos Anisakidae foram reportados em apenas 60 espécies de peixes em diferentes estudos feitos anteriormente (TAVARES; LUQUE, 2006). A maioria deles restringiu-se aos aspectos ecológicos e quantitativos.

No presente estudo, foram necropsiadas 10 espécies de peixes pertencentes à 5 ordens e 10 famílias para coleta de larvas de *Hysterothylacium* spp.

1.1. *Caulolatilus crhysops* (Valenciennes, 1833)

Caulolatilus crhysops, vulgarmente conhecido como batata-da-pedra, pertence à família Malacanthidae (Actinopterygii, Perciformes). De hábitat demersal, esta espécie é encontrada em profundidades de mais de 50 metros, sobre fundos de cascalhos, conchas e coral.

É caracterizada por possuir nadadeira dorsal com 8 espinhos e 23-24 raios; anal com 2 espinhos e 22-23 raios; peitoral com 18-19 raios. Linha lateral com 79-89 escamas com poros. 18-21 rastros (inclusive rudimentos) no primeiro arco branquial. Corpo castanho no dorso, tornando-se gradativamente mais claro lateral e inferiormente; uma mancha negra nítida acima da base da nadadeira peitoral; uma mancha clara sob o olho, estendendo-se anteriormente até às narinas; nadadeira dorsal escura, com manchas e estrias claras pequenas.

Ocorre no sudeste dos Estados Unidos, e no sul e sudeste do Brasil, nos estados do Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo (MENEZES; FIGUEIREDO, 1980; FROESE; PAULY, 2014).



Figura 1. Espécime de batata-da-pedra *Caulolatilus crhysops* (Valenciennes, 1833) coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

1.2. *Pinguipes brasilianus* Curvier, 1829

Pinguipes brasilianus, conhecido vulgarmente como michole-quati, pertence à família Pinguipedidae (Actinopterygii, Perciformes) e é uma espécie de hábitat demersal.

É caracterizada por possuir nadadeira dorsal com 7 espinhos e 26 a 27 raios e nadadeira anal com 75 a 26 raios; 94 a 95 fileiras transversais de escamas entre o ângulo superior do opérculo e a base da nadadeira caudal. Corpo escuro, com a região ventral mais clara. Tronco com cerca de 7 faixas transversais escuras largas e outras mais estreitas entre estas. Este padrão fica mais bem definido na metade inferior do corpo. Nadadeira dorsal com uma faixa escura longitudinal na parte distal e uma faixa clara submarginal longitudinal na parte mole e a margem com uma linha escura. Anal mais escura junto à margem. Caudal com uma mancha arredondada superiormente na região basal. Atinge até 40 centímetros (Figura 3).

É um peixe sem importância comercial. Sua distribuição é desde o litoral do Estado do Rio de Janeiro até Mar del Plata, Argentina (ROSA e ROSA, 1997; MENEZES; FIGUEIREDO, 1985; SZPILMAN, 2000; FROESE e PAULY, 2014).



Figura 2. Espécime de michole *Pinguipes brasilianus* Cuvier, 1829 coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

1.3. *Priacanthus arenatus* Cuvier, 1829

Priacanthus arenatus, vulgarmente conhecido como olho-de-cão, pertence à família Priacanthidae (Actinopterygii, Perciformes). É uma espécie de hábitos noturnos e vive em fundos rochosos, desde a costa até cerca de 130 metros de profundidade.

É caracterizada por possuir nadadeira dorsal com 13-15 raios; anal com 14-16. Linha lateral com 61-73 escamas. Primeiro arco branquial com 27-33 rastros, incluindo rudimentos. Vermelho claro; nadadeiras pélvicas enegrecidas. Cresce até 40 cm de comprimento (Figura 3).

Seu alimento básico consiste de peixes pequenos, crustáceos, poliquetas e larvas. É a espécie mais comum da família Priacanthidae no sudeste brasileiro.

Ocorre desde o Canadá até ao norte da Argentina (MENEZES; FIGUEIREDO, 1980; FROESE; PAULY, 2014).



Figura 3. Espécime de olho-de-cão *Priacanthus arenatus* Cuvier, 1829 coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

1.4. *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758)

Menticirrhus americanus, vulgamente conhecido como papa-terra, pertence à família Sciaenidae (Actinopterygii, Perciformes) e é uma espécie encontrada geralmente sobre fundos de areia ou areia e lama, em águas costeiras de pouca profundidade e também em regiões estuarinas.

É diagnosticado por possuir nadadeira dorsal anterior com 10 a 11 espinhos, posterior com 1 espinho e 22 a 26 raios; anal com 1 espinho e 6 a 8 raios; margem posterior da nadadeira caudal em forma de S, o lobo inferior geralmente um pouco mais longo que o superior. Rastros curtos, cerca de 10 visíveis no primeiro arco branquial em exemplares jovens, mas geralmente menos que 5 rudimentares em exemplares adultos. Parte látero-superior do corpo variando de acinzentado-clara a escura, com manchas escuras alongadas e oblíquas, às vezes pouco nítidas; parte inferior esbranquiçada; nadadeiras peitorais escuras; pélvicas, anal e dorsal posterior claras, com pigmentação escura esparsa; dorsal anterior com a parte superior enegrecida; caudal com a margem terminal enegrecida.

Alimentam-se de invertebrados bentônicos que vivem na areia, como crustáceos e vermes.

Ocorre desde os Estados Unidos até a Argentina (MENEZES; FIGUEIREDO, 1980; SZPILMAN, 2000; FROESE; PAULY, 2014).



Figura 4. Espécime papa-terra *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) (Fonte: Fishbase.org).

1.5. *Sarda sarda* (Bloch, 1793)

Sarda sarda, vulgarmente conhecido como serra, pertence à família Scombridae (Actinopterygii, Perciformes). É uma espécie que habita a superfície de águas costeiras e oceânicas, formando cardumes. Costumam penetrar nos estuários.

É caracterizada por possuir nadadeira dorsal com 20-23 espinhos, segunda com 15-18 raios 7-9 pínulas. Nadadeira anal com 14-17 raios e 6-8 pínulas. Primeiro arco branquial com 16-23 rastros. A região látero-superior do corpo é azul metálica, com 5 a 11 estrias escuras, sinuosas e oblíquas, típicas da espécie. É um escombrídeo relativamente pequeno, chegando a medir um pouco mais de 90 centímetros.

Ocorre nas águas tropicais e temperadas do atlântico, Mediterrâneo e Negro. Na costa leste da América, distribui-se desde Nova Scotia até a Argentina (MENEZES; FIGUEIREDO, 2000).



Figura 5. Espécime de serra *Sarda sarda* (Bloch, 1793) coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

1.6. *Prionotus punctatus* (Bloch, 1793)

Prionotus punctatus, vulgarmente conhecido como cabrinha, pertence à família Triglidae (Actinopterygii, Scorpaeniformes). É uma espécie muito comum em todo o litoral brasileiro, encontrada em fundos de areia, lama e também em poças de pedra da zona entre-marés e perto de águas estuarinas.

É caracterizada por possuir nadadeira com 10 espinhos e 12-13 raios; Peitoral com 3 raios unidos por membrana e 3 raios livres inferiores; anal com 11 raios; 9-10 rastros desenvolvidos e 6-10 rudimentos na parte inferior do primeiro arco branquial. Nadadeira peitoral relativamente longa, quase sempre maior que o comprimento da cabeça. Corpo castanho claro na parte dorsal, tornando-se claro inferiormente; manchas escuras arredondadas presentes principalmente nas partes dorsal e lateral superior do corpo; membrana que liga os espinhos da nadadeira dorsal escura, às vezes com uma mancha negra entre o quarto e quinto espinhos; dorsal posterior com manchas escuras pequenas e arredondadas; nadadeira peitoral enegrecida, um pouco mais clara superiormente onde aparecem mais frequentemente manchas negras ovaladas e com margem ventral azul; nadadeira caudal com manchas escuras arredondadas relativamente grandes, as vezes dispostas verticalmente, formando barras escuras.

Sua alimentação consiste principalmente de peixes, crustáceos e moluscos.

Ocorre nas águas tropicais e temperadas da costa atlântica das Américas Central e do Sul. (MENEZES; FIGUEIREDO, 1980; SZPILMAN, 2000; FROESE; PAULY, 2014)



Figura 6. Espécime de cabrinha *Prionotus punctatus* (Bloch, 1793) coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

1.7. *Merluccius hubbsi* Marini, 1933

Merluccius hubbsi, vulgarmente conhecido como merluza, pertence à família Merlucciidae (Actinopterygii, Gagiformes), sendo a única espécie da família no Brasil. Alimenta-se de crustáceos pelágicos, lulas e peixes. Possui uma considerável importância econômica.

É caracterizada por possuir acentuadas depressões nas nadadeiras dorsal e anal, de modo que a primeira aparece dividida em três partes e a segunda em duas. Ambas compostas de numerosos raios e contíguas à caudal. Nadadeiras pélvicas localizadas um pouco adiante das peitorais. Boca ampla, com dentes numerosos bem desenvolvidos. Chegam até 95 centímetros de comprimento.

Ocorrem normalmente até 200 metros de profundidade. Sua distribuição é do Sudeste do Brasil até a Argentina (MENEZES; FIGUEIREDO, 1985; FROESE; PAULY, 2014).



Figura 7. Espécime de merluza *Merluccius hubbsi* Marini, 1933 coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

1.8. *Mullus argentinae* Hubbs e Marini, 1933

Mullus argentinae, vulgarmente conhecido como trilha, pertence à família Mullidae (Actinopterygii, Perciformes). É uma espécie costeira encontrada mais comumente em fundos de lama.

É caracterizada por possuir nadadeira dorsal anterior com 8 a 9 espinhos, o primeiro muito mais curto que o segundo; nadadeira dorsal posterior com 1 espinho e 8 raios; peitoral com 15-17 raios. Parte superior do primeiro arco branquial com 5 a 7 rastros e parte inferior com 15 a 17.

O corpo é avermelhado; nadadeira dorsal anterior com a ponta enegrecida e vestígios de faixas escuras estreitas nas partes mediana e basal; segunda nadadeira dorsal com vestígios de faixas diagonais escuras; lobos da nadadeira caudal com 3 faixas diagonais escuras às vezes pouco evidente.

Ocorre exclusivamente no Atlântico sul ocidental, do Rio de Janeiro até Mar del Plata, Argentina (MENEZES; FIGUEIREDO, 1985; FROESE; PAULY, 2014).



Figura 8. Espécime de trilha *Mullus argentinae* Hubbs & Marini, 1933 (16 cm) coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

1.9. *Gymnothorax vicinus* (Castelnau, 1855)

Gymnothorax vicinus, vulgarmente conhecido como moreia, pertence à família Muraenidae (Actinopterygii, Anguilliformes). É uma espécie comumente encontrada em regiões de pedra e menos frequentes em regiões de corais.

É caracterizada por possuir nadadeira anal e parte posterior da dorsal com a margem branca, contrastando com a margem submarginal enegrecida dessas nadadeiras. O corpo pode apresentar dois padrões principais de cor. No mais comum aparecem manchas escuras de diferentes tonalidades, que não contrastam com o colorido geral do corpo. Estas manchas geralmente se fundem, restringindo a cor mais clara a um retículo escurecido. Possuem uma mancha negra alongada no canto da boca.

Ocorre em ambos os lados do Oceano Atlântico. No Atlântico Ocidental, distribui-se desde os EUA até o Sudeste do Brasil (MENEZES; FIGUEIREDO, 1985; FROESE; PAULY, 2014).



Figura 9. Espécime de moreia *Gymnothorax vicinus* (Castelnau, 1855) coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

1.10. *Zenopsis conchifer* (Lowe, 1852)

Zenopsis conchifer, vulgarmente conhecido como galo-de-fundo, é o único representante da família Zeidae (Actinopterygii, Zeiformes) que ocorre no Brasil. Esta espécie ocorre em águas profundas, afastadas do litoral.

É caracterizada por possuir nadadeira dorsal com 9-10 espinhos e 25-27 raios, nadadeira anal com 3 espinhos e 24-26 raios. Corpo prateado com manchas escuras arredondadas mais evidentes nos exemplares jovens. A altura do corpo varia conforme o tamanho dos indivíduos, sendo os menores proporcionalmente mais altos. Atinge cerca de 60 cm de comprimento.

É uma espécie amplamente distribuída, sendo que no Atlântico ocorre desde a Ilha Sable no Canadá até o norte da Argentina (MENEZES; FIGUEIREDO, 1980; SZPILMAN, 2000; FROESE; PAULY, 2014).



Figura 10. Espécime de galo-do-fundo *Zenopsis conchifer* (Lowe, 1852) coletado no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

Objetivo deste estudo foi identificar larvas e adultos de *Hysterothylacium* spp. no litoral do Estado do Rio de Janeiro utilizando juntamente metodologias morfológicas e moleculares, além de avaliar o estágio de desenvolvimento e inferir relações filogenéticas entre os táxons.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedência dos hospedeiros e coleta dos nematoides anisaquídeos

Oitenta espécimes de peixes, incluindo *Caulolatilus chrysops*, *Gymnothorax vicinus*, *Menticirrhus americanus*, *Merluccius hubbsi*, *Mullus argentinae*, *Pinguipes brasilianus*, *Prionotus punctatus*, *Priacanthus arenatus*, *Sarda sarda* e *Zenopsis conchifer* foram obtidos no CEASA (Centrais Estaduais de Abastecimento), na cidade do Rio de Janeiro, RJ, sendo capturados por pescadores profissionais na costa de Cabo Frio (23°S, 42°W) entre janeiro e setembro de 2014. Os peixes foram mantidos em caixas térmicas com gelo, transportados até o Laboratório de Parasitologia de Peixes (UFRRJ) e imediatamente foram feitas as necropsias. A identificação dos peixes foi feita segundo Menezes e Figueiredo (1980, 1985 e 2000) e Rosa e Rosa (1997). Através de uma incisão ventral desde a abertura anal até a linha do opérculo, foram feitas as necropsias, expondo assim a cavidade corporal. Todos os órgãos internos foram individualizados, colocados em placa de Petri, regados com solução salina fisiológica 0,65% NaCl, e posteriormente examinados através de microscópio estereoscópico para coleta dos anisaquídeos.

Os nematoides anisaquídeos foram coletados no intestino, cavidade abdominal e estômago. Para análise morfológica foram fixados em formalina 4% e após 48h foram transferidos para o álcool 70° GL. Para análise molecular, foram fixados em álcool 80° GL.

2.2. Análise morfológica

Para análise morfológica, os anisquídeos foram fixados em formalina 4% e após 48h, foram transferidos para etanol 70%. Para os estudos de microscopia de luz, foram feitas as montagens das lamínas onde os nematoides foram clarificados em lactofenol de Amann (1:1:2:1 de fenol; ácido láctico: glicerina: água), e posteriormente foram feitas as medições no microscópio Olympus BX51 através do software Cell^R&Cell^RImaging Life Science Microscopy. As medidas (média seguida pela amplitude entre parênteses) foram dadas em micrômetros. Os desenhos foram feitos com o auxílio de um tubo de desenho anexado ao microscópio de contraste de fases Olympus BX53. A identificação e classificação dos anisquídeos em nível de gênero foi feita segundo Anderson (2009) e Luque et al. (2011).

2.3. Análise molecular

Para análise molecular, alguns nematoides anisquídeos foram partidos em três partes. As partes anterior e posterior foram fixadas em formalina 5% também foram caracterizadas morfológicamente e utilizada para confecção dos desenhos. A parte mediana do corpo foi fixada em álcool 80° GL para posterior extração de DNA.

2.3.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Billings et al. (1998), modificado como descrito a seguir: as amostras foram lavadas três vezes em água ultrapura antes da realização da extração de DNA. Em seguida foram maceradas com o auxílio de uma ponteira estéril em 200µl de tampão de digestão (NaCl 0,1M; TRIS-HCl 0,21M pH 8,0; EDTA 0,05M e SDS 0,5%) e incubadas por 30 minutos a 37°C. Foram adicionados 20µl de Proteinase K (20mg/mL – Promega) e as amostras foram incubadas a 55°C por 12h com homogeneizações ocasionais.

Após a digestão seguiu-se a etapa com fenol/clorofórmio na qual foram adicionados 200µL de fenol, agitou-se os microtubos por 5 minutos por inversão. Após agitação os microtubos foram centrifugados a 14000rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para um microtubo novo estéril. Foram adicionados 100µL de fenol e 100µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Agitou-se por 5 minutos os microtubos por inversão e depois foram centrifugados a 14000rpm por 2 minutos. Este passo foi repetido por 3 vezes. Em seguida foram adicionados 200µL clorofórmio/álcool isoamílico e centrifugou-se por 14000rpm por 2 minutos e o sobrenadante resultante transferido para um novo microtubo de 1,5mL.

O DNA foi precipitado em 400µL de etanol 100% “overnight” a -20°C. Após a precipitação, as amostras foram retiradas do freezer e centrifugadas a 14000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 400µL de etanol 70%. Após a lavagem e homogeneização por inversão as amostras foram centrifugadas a 14000rpm por 10 minutos e o etanol 70% foi descartado. O pellet foi deixado para secar por 30 minutos. O DNA foi ressuscitado em 30µL de água ultrapura. O DNA foi em seguida quantificado em espectrofotômetro Biowave DNA (Biochrom, Cambridge, UK) e armazenado a 4°C até a amplificação.

2.3.2. Reações em cadeia da polimerase (PCR) das regiões intergênicas (ITS 1, 5.8S e ITS 2) do DNA ribossomal (rDNA)

Para reação em cadeia da polimerase (PCR) para ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA foram utilizados os oligonucleotídeos NC5 (Forward; 5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3') e NC2 (Reverse; 5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT 3') desenhados por Zhu et al. (1998). O volume final da reação foi de 25 µl, sendo 2,5 µl de tampão de reação (10X), 1,5 µl de MgCl₂ (50mM), 2,5 µl de dNTP's (2,5mM), 2,5 µl de primers (10mM), 1 unidade de Taq DNA polimerase (5 unidades por 1 microlitro), 13,8 µl de H₂O e 2,5 µl de DNA extraído. As amostras foram colocadas no termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf) e submetidas às seguintes condições: pré-aquecimento 94°C por 30 segundo, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 55°C por 30 segundos (anelamento), 72°C por 30 segundos (extensão) e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

2.3.3. Reações em cadeia da polimerase (PCR) da região codificante da subunidade II da citocromo oxidase (*Cox-2* mtDNA)

Para reação em cadeia da polimerase (PCR) da região *cox-2* mtDNA foram utilizados os oligonucleotídeos 211 (5'- TTTTCTAGTTATATATAGATTGRTTTYAT) e 210 (Reverse; 5'- CACCAACTCTTAAAATTATC- 3') desenhados por Nadler e Hudspeth (2000). O volume final da reação foi de 25 µl, sendo 2,5 µl de tampão de reação (10X), 2 µl de MgCl₂ (50mM), 2 µl de dNTP's (2,5mM), 4 µl de primers (10mM), 2 unidades de Taq DNA polimerase (5 unidades por 1 microlitro), 12.1 µl de H₂O e 2 µl de DNA extraído. As amostras foram colocadas no termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf) e submetidas às seguintes condições: pré-aquecimento 94°C por 30 segundo, seguido de 34 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 46°C por 60 segundos (anelamento), 72°C por 90 segundos (extensão) e um ciclo final de 72°C por 10 minutos.

2.3.4. Visualização e purificação dos produtos amplificados pela PCR

O produto da PCR foi visualizado com Sybergreen (Invitrogen, Eugene, OR, USA) em gel de agarose a 1,5%. Todos os produtos amplificados durante a PCR foram purificados com o Kit *Exo-SAP-IT* (GE Healthcare Life Sciences) seguindo as instruções do fabricante.

2.3.5. Determinação das sequências nucleotídicas

A partir dos produtos purificados foram realizadas as reações de sequenciamento de DNA com o conjunto de diagnóstico ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems-Perkin Elmer) de acordo com o protocolo utilizado pelo Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ, como segue: 1.5 µl de Big Dye, 1.25 µl de tampão, oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 3.2 pmol/µl, 2.5µl de produto da PCR purificado e água para completar a reação para o volume final de 10 µl. A reação foi submetida ao mesmo ciclo de sequenciamento e depois sequenciadas ambas as fitas com o uso do sequenciador de DNA automático MegaBACE (GE Healthcare Life Science) do DPA-UFRRJ.

2.3.6. Análise computacional das sequências nucleotídicas

As sequências foram obtidas em forma de cromatogramas e analisadas no programa Geneious 8.5 (<http://www.geneious.com>). Assim, durante a edição das sequências foram verificadas possíveis ambiguidades em decorrência de erros de leitura do sequenciamento. O consenso das sequências referentes aos genes ITS 1, 5.8S e ITS 2 do rDNA e *cox-2* do mtDNA foram alinhados separadamente usando o algoritmo E-INS-i do programa MAFFT (KATO et al., 2002) implementado no programa Geneious. Os alinhamentos dos genes foram submetidos à análise de inferência Bayesiana (IB). As árvores filogenéticas das análises de IB foram calculadas e construídas a partir do modelo de evolução GTR+I+G usando os plug-ins PHYML (GUINDON; GASCUEL, 2003) e MrBayes (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001) do programa Geneious, respectivamente. O modelo evolutivo foi escolhido utilizando o programa jModelTest 2 (GUINDON; GASCUEL, 2003; DARRIBA et al., 2012). A análise de IB foi rodada por 2×10^6 generations, com amostragem de toda 500ª árvore e descartando uma fração “burn-in” de 55×10^5 árvores.

3. RESULTADOS

Oitenta peixes pertencentes à cinco ordens e dez famílias foram examinados (Tabela 1). Foram encontrados e descritos 4 morfotipos de larvas. Espécimes adultos de *Hysterothylacium spirale* Rossin, Datri, Inorvaia & Timi, 2011 e *Hysterothylacium* sp. parasitos de *Zenopsis conchifer* e *Priacanthus arenatus*, respectivamente foram também sequenciados para comparação com os resultados dos sequenciamentos das larvas. Novos registros parasito/hospedeiro foram feitos.

Tabela 1. Peixes coletados e examinados para coleta de larvas de *Hysterothylacium* spp. no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Ordem	Família	Espécie	N
Perciformes	Malacanthidae	<i>Caulolatilus chrysops</i>	4
	Mullidae	<i>Mullus argentiniae</i>	9
	Pinguipedidae	<i>Pinguipes brasiliensis</i>	1
	Priacanthidae	<i>Priacanthus arenatus</i>	9
	Sciaenidae	<i>Menticirrhus americanus</i>	5
	Scombridae	<i>Sarda sarda</i>	1
Gadiformes	Merlucciidae	<i>Merluccius hubbsi</i>	6
Scorpaeniformes	Triglidae	<i>Prionotus punctatus</i>	38
Anguiliformes	Muraeidae	<i>Gymnothorax vicinus</i>	1
Zeiformes	Zeidae	<i>Zenopsis conchifer</i>	6

3.1. *Hysterothylacium* sp. (L3) morfotipo I

A análise morfológica do gênero *Hysterothylacium* morfotipo I foi feita baseando-se em 10 espécimes e mostrou pequenos nematoides com cutícula lisa e esbranquiçada. Lábios pouco desenvolvidos e poro excretor localizado próximo ao anel nervoso. Ceco intestinal longo e apêndice ventricular menor do que o esôfago. Cauda digitiforme com mucro terminal.

(Figura 11). As medidas estão incluídas na tabela II. Este morfotipo foi encontrado em *P. punctatus*, *M. hubbsi* e *G.vicinus*.

Sítios de infecção: cavidade abdominal, estômago e intestino.

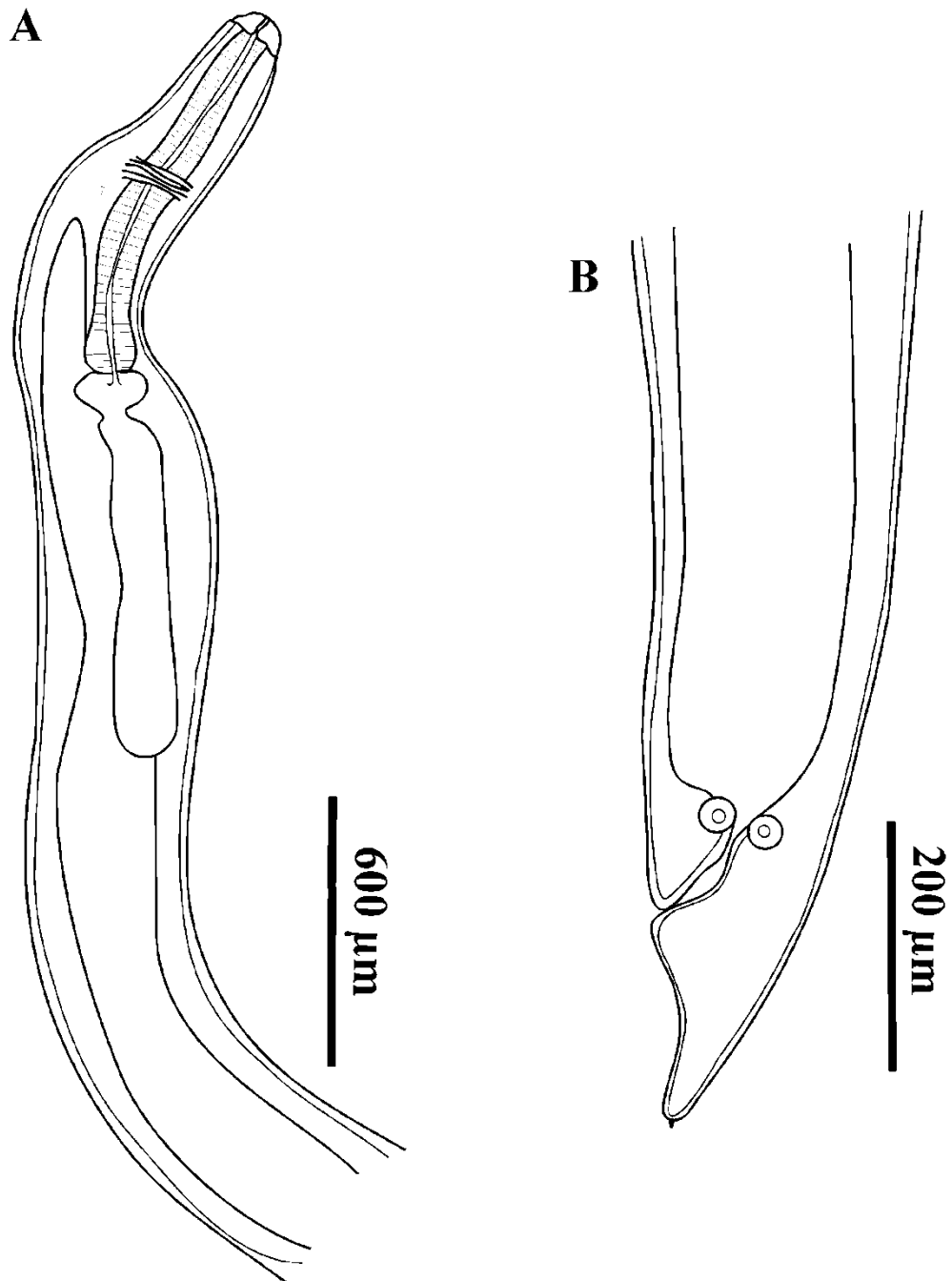


Figura 11. Região anterior com poro excretor próximo ao anel nervoso. Ceco intestinal longo (A) e região posterior com mucro terminal de *Hysterothylacium* sp. (vista ventral) em *Prionotus punctatus*.

3.2. *Hysterothylacium* sp. (L3) morfotipo II

A análise morfológica do gênero *Hysterothylacium* morfotipo II foi feita baseando-se em 10 espécimes e mostrou pequenos nematoides com cutícula lisa e esbranquiçada. Lábios pouco desenvolvidos e poro excretor localizado próximo ao anel nervoso. Cauda digitiforme com mucro terminal. Ceco curto e apêndice ventricular maior do que o esôfago (Figura 12). As medidas estão incluídas na tabela II. Este morfotipo foi encontrado em *C. chrysops*, *M. americanus*, *M. argentinae* e *Z. conchifer*.

Locais de infecção: cavidade abdominal, estômago e intestino.

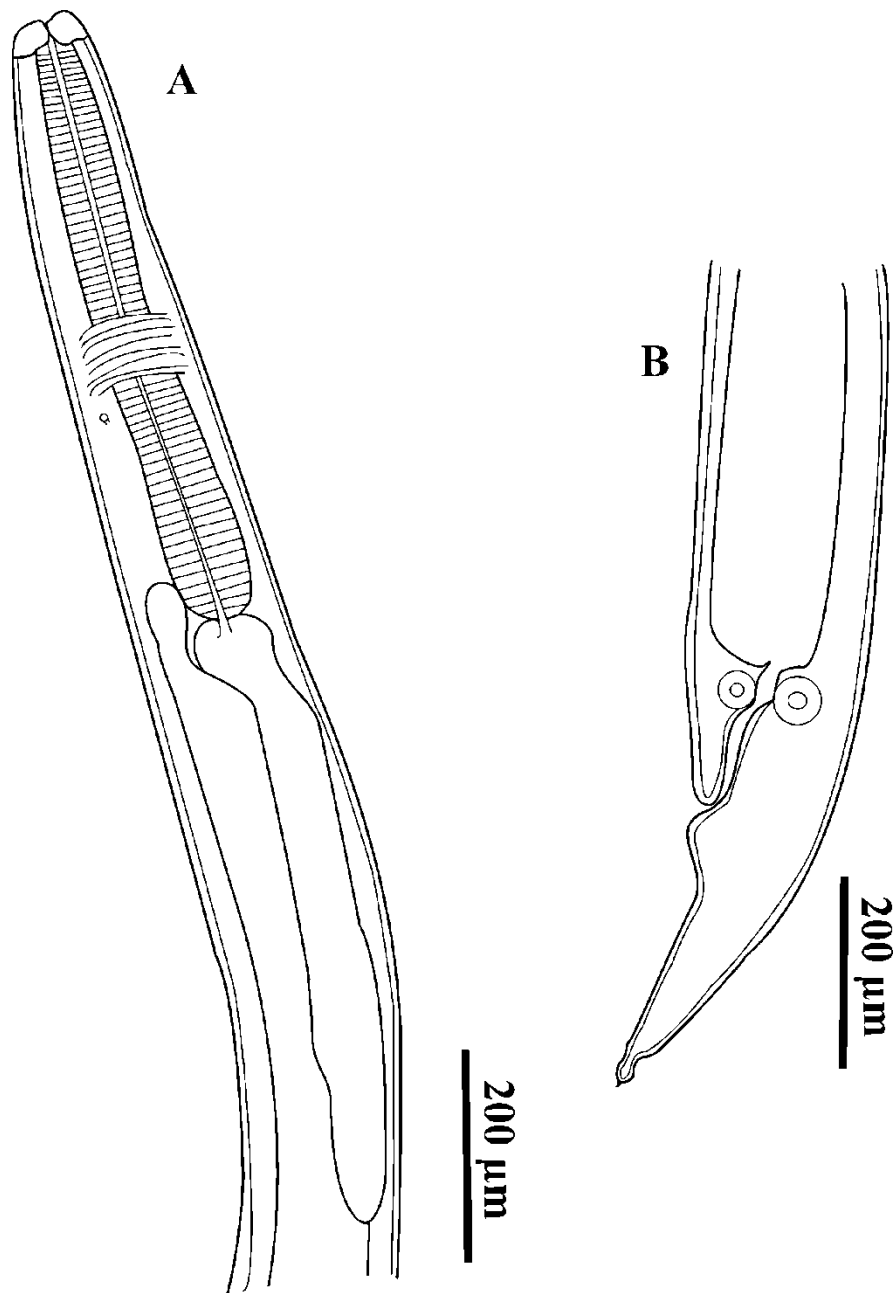


Figura 12. Região anterior com poro excretor próximo ao anel nervoso. Ceco curto (A) e região posterior com mucro terminal de *Hysterothylacium* sp. (vista ventral) em *Caulolatilus chrysops*.

3.3. *Hysterothylacium* sp. (L4) morfotipo III

A análise morfológica do gênero *Hysterothylacium* morfotipo III foi feita baseando-se nas partes anterior e posterior de 2 espécimes e mostrou pequenos nematoides com cutícula lisa e esbranquiçada. Lábios em desenvolvimento e poro excretor localizado próximo ao anel nervoso. Cauda com 5-7 espinhos terminais. Ceco longo (Figura 13). As medidas estão incluídas na tabela II. Este morfotipo foi encontrado em *S. sarda* e *P. arenathus*.

Local de infecção: Intestino

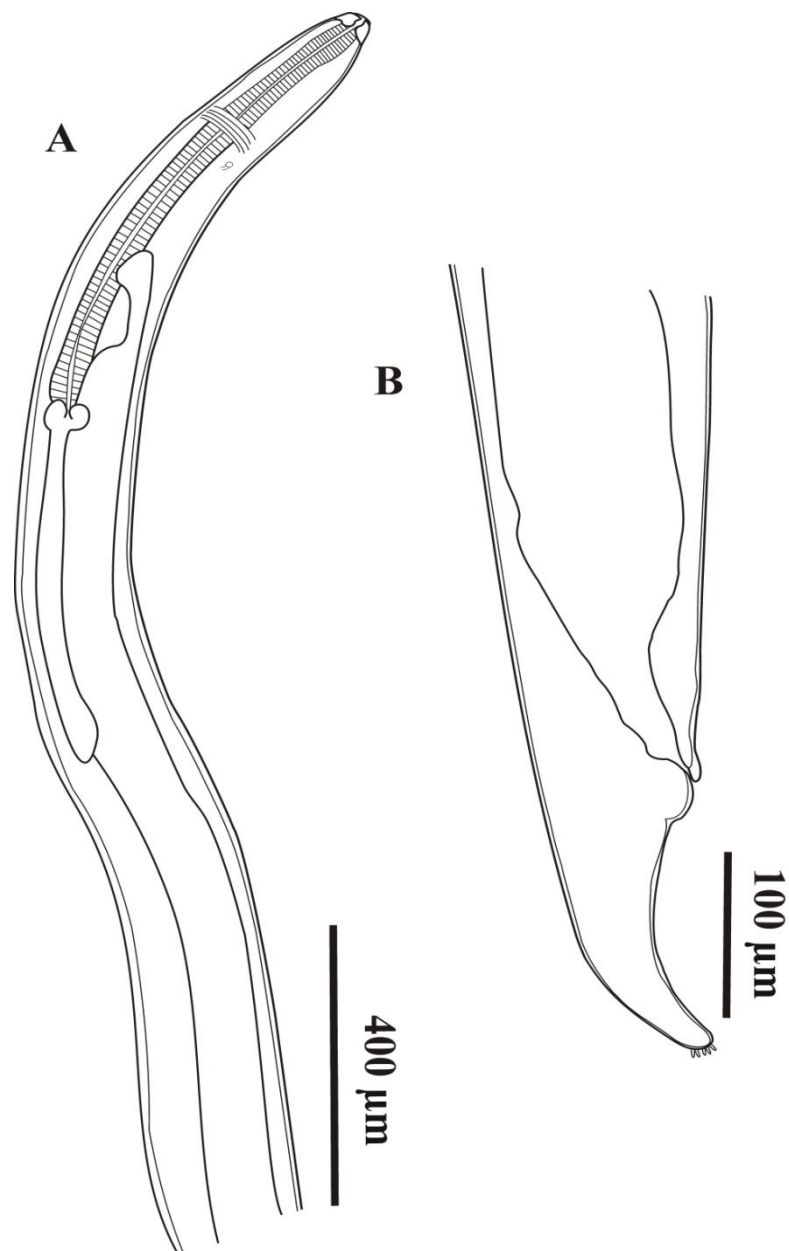


Figura 13. Região anterior com lábios em desenvolvimento, poro excretor próximo ao anel nervoso. Ceco intestinal longo (A) e região posterior com cauda com 5-7 espinhos terminais de *Hysterothylacium* sp. (vista ventral) em *Priacanthus arenatus*.

3.4. *Hysterothylacium* sp. (L4) morfotipo IV

A análise morfológica do gênero *Hysterothylacium* morfotipo IV foi feita baseando-se nas partes anterior e posterior de apenas 1 espécime e mostrou um pequeno nematoide com cutícula lisa e esbranquiçada. Lábios desenvolvidos. Não foi possível visualizar poro excretor. Ceco intestinal e apêndice ventricular presentes. Cauda com incontáveis pequenos espinhos terminais. Ceco longo (Figura 14). As medidas estão incluídas na tabela II. Este morfotipo foi encontrado em *Pinguipes brasilianus*.

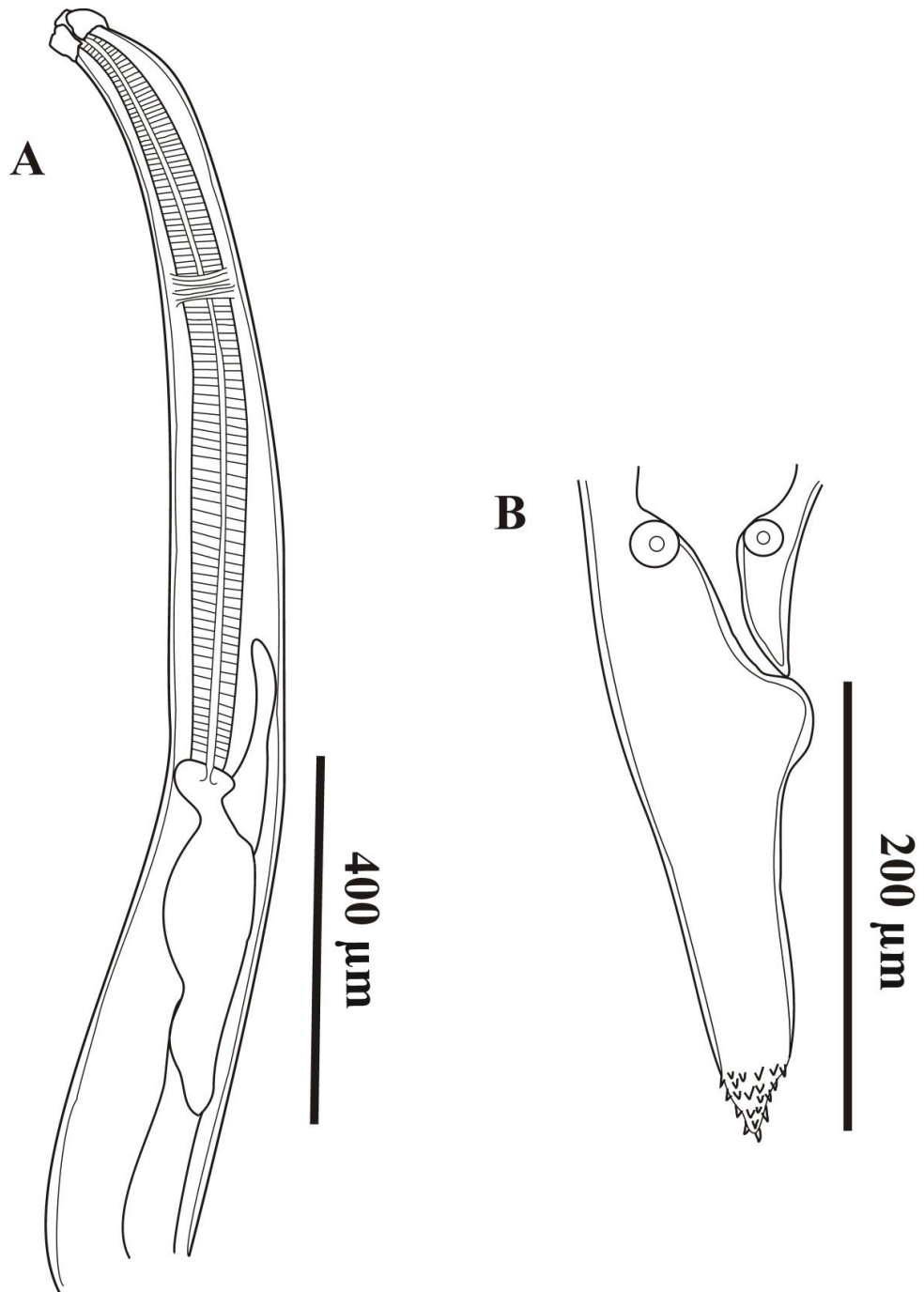


Figura 14. Região anterior com lábios desenvolvidos (A) e região posterior com cauda com incontáveis pequenos espinhos terminais de *Hysterothylacium* sp. (vista ventral) em *Pinguipes brasilianus*.

Tabela 2. Comparação dos valores médios (micrômetros) e amplitude de variação da morfometria de larvas de quatro morfotipos de *Hysterothylacium* sp. parasitos de 10 espécies de hospedeiros do litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

<i>Hysterothylacium</i> sp.	Morfotipo I	Morfotipo II	Morfotipo III	Morfotipo IV
<i>N</i>	10	10	1	1
Comp. Corpo	15,251 (10,536-20,345)	7,603 (7,423- 7,815)	-	-
Larg. Corpo	432 (345-490)	274 (256-291)	162 (139-188)	365
Comp. Esôfago	1,602 (1,245-1,987)	682 (604-732)	629 (580-679)	1,393
Ventrículo	137 (98-175)	88 (83-95)	64 (54-75)	147
Apêndice ventricular	1,171(987-1,567)	835 (715-890)	5553 (440-667)	397
Ceco intestinal	456 (389-678)	171 (149-180)	1181 (120-242)	271
Cauda	243(187-301)	206 (196-218)	105 (102-109)	205
Razão esôfago/ventrículo	1:0,07 (0,05-0,12)	1:0,13 (0,12-0,14)	1:0,10 (0,09-0,11)	1:0,10
Razão esôfago/ceco intestinal	1:0,30 (0,22-0,50)	1:0,25 (0,21-0,31)	1:0,25 (0,21-0,36)	1:0,19
Razão esôfago/apêndice ventricular	1:0,82 (0,74-0,90)	1:0, 81 (0,68-0,87)*	1:0,87 (0,76– 0,98)	1:0,28

*Relação Apêndice ventricular/esôfago

DNA de um mesmo espécime de *Hysterothylacium* foi utilizado tanto para análise de ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA como para *cox2* mtDNA. As sequências parciais nucleotídicas obtidas no presente estudo e sequências de espécies utilizadas para comparação e construção das árvores filogenéticas estão disponíveis na tabela 3.

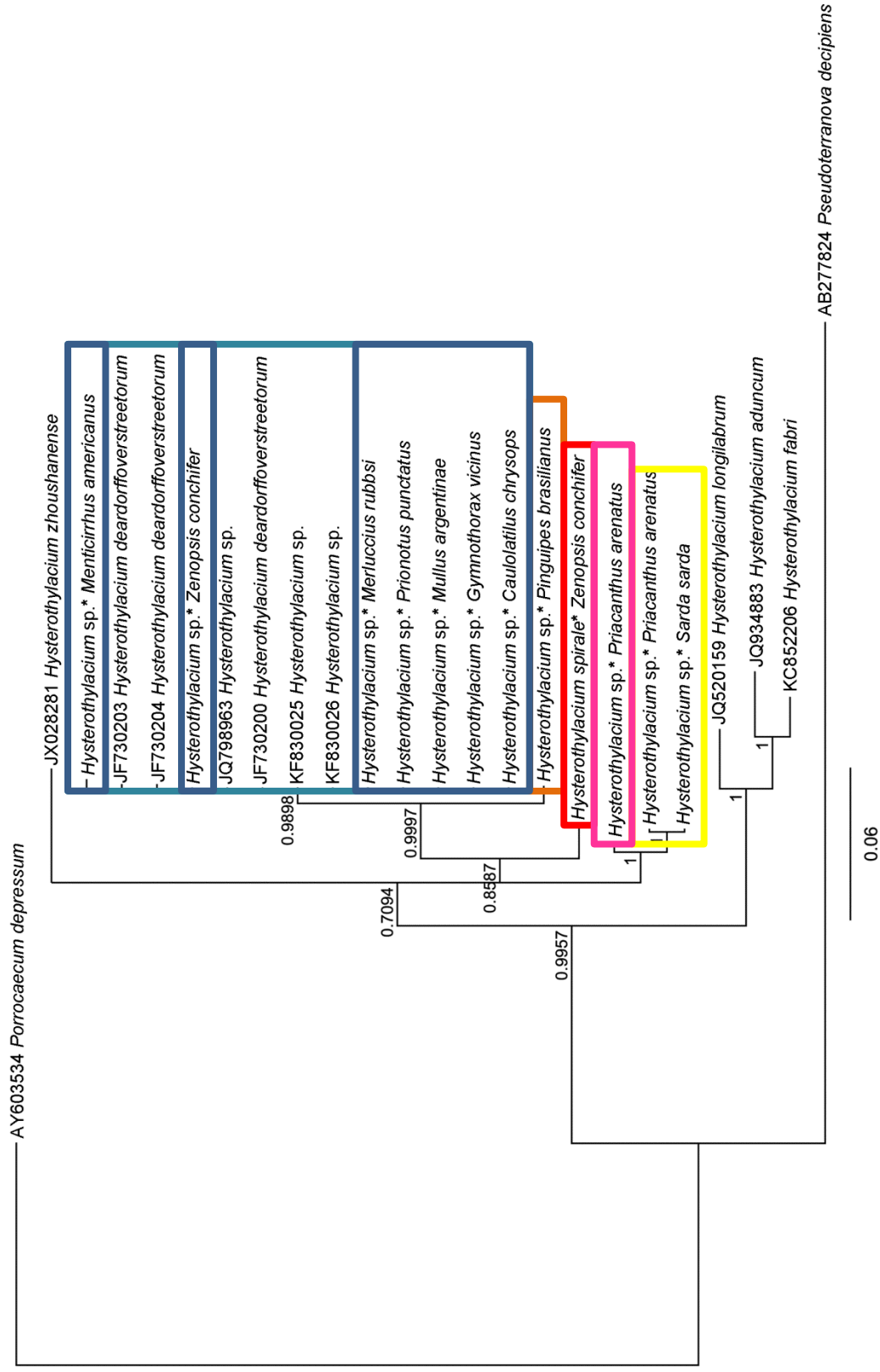


Figura 15. Árvore construída a partir do modelo PHYLML com sequências de *Hysterothylacium* spp. obtidas neste estudo (*) e sequências de *Hysterothylacium* spp. obtidas no GenBank, a partir dados de ITS 1 e 2 rDNA. O número representa o suporte dos ramos pela probabilidade posterior Bayesiana (para 2×10^6 gerações; “bur-in” = 1×10^3). *Porrocaecium depressum* e *Pseudoterranova decipiens* foram utilizados como grupos externos.

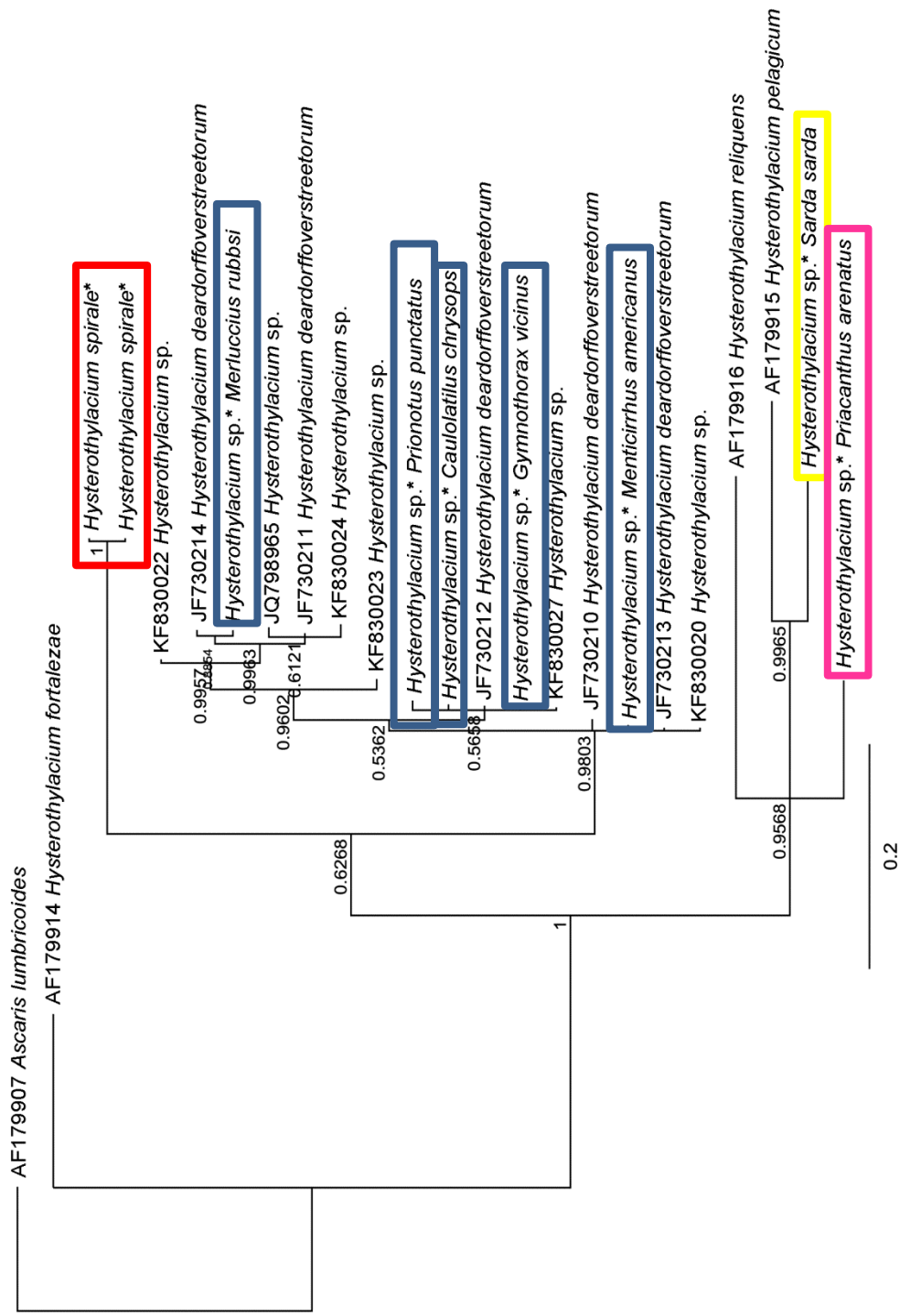


Figura 16. Árvore construída a partir do modelo PHYML com seqüências de *Hysterothylacium* spp. obtidas neste estudo (*) e seqüências de *Hysterothylacium* spp. obtidas no GenBank, a partir dados de *cox-2* mtDNA. O número representa o suporte dos ramos pela probabilidade posterior Bayesiana (para 2×10^6 gerações; “bur-in” = 1×10^3). *Ascaris lumbricoides* foi utilizado como grupo externo.

Tabela 3. Lista das espécies de anisacídeos encontrados no atual estudo e espécies depositadas no GenBank utilizadas para comparação e construção das árvores filogenéticas.

Região	Espécie	Nº de acesso GenBank	Referência	
ITS	<i>Hysterothylacium</i> sp.	-	Presente estudo	
	<i>Hysterothylacium</i> sp.	-	Presente estudo	
	<i>Hysterothylacium</i> sp.	-	Presente estudo	
	<i>Hysterothylacium</i> sp.	-	Presente estudo	
	<i>Hysterothylacium</i> sp.	-	Presente estudo	
	<i>Hysterothylacium</i> sp.	-	Presente estudo	
	<i>Hysterothylacium</i> sp.	-	Presente estudo	
	<i>Hysterothylacium</i> sp.	-	Presente estudo	
	<i>Hysterothylacium</i> sp.	-	Presente estudo	
	<i>Hysterothylacium</i> sp.	-	Presente estudo	
	<i>Hysterothylacium</i> sp.	JF830025	Não publicado	
	<i>Hysterothylacium</i> sp.	JF830026	Não publicado	
	<i>Hysterothylacium</i> sp.	JQ798963	Borges et al., (2012)	
	<i>Hysterothylacium deardorffoverstreetorum</i>	JF730200	Knoff et al., (2012)	
	<i>H. deardorffoverstreetorum</i>	JF730203	Knoff et al., (2012)	
	<i>H. deardorffoverstreetorum</i>	JF730204	Knoff et al., (2012)	
	<i>Hysterothylacium zhoushanensis</i>	JX028281	Li et al. (2012)	
	<i>Hysterothylacium longilabrum</i>	JQ520159	Li et al. (2012)	
	<i>Hysterothylacium aduncum</i>	JQ934883	Vardic Smrzlic et al. (2012)	
	<i>Hysterothylacium fabri</i>	KC852206	Pekmezci et al. (2014)	
	<i>Hysterothylacium spirale</i>	-	Não publicado	
	<i>Pseudoterranova decipiens</i>	AB277824	Umehara et al., (2008)	
	<i>Porrocaecum depressum</i>	AY603539	Não publicado	
	Cox2	<i>Hysterothylacium</i> sp.	-	Presente estudo
		<i>Hysterothylacium</i> sp.	-	Presente estudo
		<i>Hysterothylacium</i> sp.	-	Presente estudo
		<i>Hysterothylacium</i> sp.	-	Presente estudo
<i>Hysterothylacium</i> sp.		-	Presente estudo	
<i>Hysterothylacium</i> sp.		KF830020	Não publicado	
<i>Hysterothylacium</i> sp.		KF830022	Não publicado	
<i>Hysterothylacium</i> sp.		KF830023	Não publicado	
<i>Hysterothylacium</i> sp.		KF830024	Não publicado	
<i>Hysterothylacium</i> sp.		KF830027	Não publicado	
<i>Hysterothylacium</i> sp.		JQ798965	Borges et al., (2012)	
<i>Hysterothylacium deardorffoverstreetorum</i>		JF730210	Knoff et al., (2012)	
<i>H. deardorffoverstreetorum</i>		JF730211	Knoff et al., (2012)	
<i>H. deardorffoverstreetorum</i>		JF730212	Knoff et al., (2012)	
<i>H. deardorffoverstreetorum</i>		JF730213	Knoff et al., (2012)	
<i>H. deardorffoverstreetorum</i>		JF730214	Knoff et al., (2012)	
<i>Hysterothylacium spirale</i>		-	Presente estudo	

<i>H. spirale</i>	-	Presente estudo
<i>Hysterothylacium fortalezae</i>	AF179914	Nadler e Hudspeth (2000)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	AF179907	Nadler e Hudspeth (2000)
<i>Hysterothylacium reliquens</i>	AF179916	Nadler e Hudspeth (2000)
<i>Hysterothylacium pelagicum</i>	AF179915	Nadler e Hudspeth (2000)

Larvas de *Hysterothylacium* sp. foram reportadas pela primeira em *C. chrysops*, *M. argentinae*, *P. arenatus*, *S. sarda*, *G. vicinus* e *Z. conchifer* no litoral do Estado do Rio de Janeiro.

A análise genética não permitiu a identificação específica de nenhum morfotipo. Os morfotipos I e II mostraram geneticamente pertencer ao mesmo grupo. O morfotipo III mostrou alta similaridade com *H. pelagicum* e o morfotipo IV apresentou genótipo distinto.

4. DISCUSSÃO

Os morfotipos I e II mostraram características semelhantes em relação ao formato da cauda, enquanto o comprimento do ceco intestinal e a relação esôfago/ventrículo apresentaram-se de forma diferentes. Essa diferenciação, suportada pela análise molecular, indicou apenas uma variação morfológica que pode estar relacionada com o tipo de hospedeiro e ambiente.

Em análise de ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA esses morfotipos mostraram ser semelhantes, com todos os espécimes agrupados em um único clado bem suportado juntamente com sequência de larvas de *Hysterothylacium* sp. e *H. deardorffoverstreeterum* Knoff, Felizardo, Iniguez, Torres, Pinto & Gomes, 2012 previamente sequenciadas e depositados no GenBank. Em análise de *cox-2* mtDNA foram observados diferentes clados entre os espécimes sequenciados no atual estudo, espécimes de *Hysterothylacium* sp. e *H. deardorffoverstreeterum*. O clado maior que une todos os outros clados mostrou alto suporte, indicando que os morfotipos I e II provavelmente sejam *H. deardorffoverstreeterum*. Esses clados também foram observados entre as espécies de *Hysterothylacium* sp. e *H. deardorffoverstreeterum* em análise de *cox-2* em estudos feitos anteriormente no litoral do Estado do Rio de Janeiro (BORGES et al., 2012; PANTOJA et al., – dados não publicados). Optamos por manter a identificação das larvas desses dois morfotipos, mesmo a filogenia mostrando proximidade com *H. deardorffoverstreeterum* em nível de gênero devido à ausência de sequência de DNA das formas adultas desta espécie e também devido à observação de clados distintos entre sequências de mesmo nome.

Hysterothylacium deardorffoverstreeterum foi descrita baseando-se em dados morfológicos e moleculares de larvas de terceiro e quarto estágio. Até o momento, não se conhece a morfologia e não há sequência de DNA dos espécimes adultos depositada no GenBank. Isso impossibilita saber se realmente *H. deardorffoverstreeterum* é uma nova espécie. Pois se todas as espécies do gênero obtivessem sequência de DNA dos espécimes adultos e estas larvas encontradas e descritas em *Paralichthys isosceles* Jordan, 1890 não mostrasse alta similaridade com nenhuma delas, haveria sim indícios de uma nova espécie. Mas até o momento são poucas espécies do gênero que possuem dados moleculares depositados.

Para melhor entendimento do que está ocorrendo dentro da análise de *cox-2* mtDNA é necessário em primeiro lugar conhecer os adultos de *H. deardorffoverstreeterum* para verificar se há ocorrência de apenas polimorfismo de DNA, ou tendo em conta a possibilidade de haver um complexo de espécies com características morfológicas compartilhadas ou muito

semelhantes que poderiam explicar a ocorrência destes clados distintos. Ainda sim seria necessário incluir outros tipos de análises, tais como eletroforese de isoenzimas, que vem demonstrando ser uma boa ferramenta para este tipo de estudo com outras espécies de anisacuídeos, como por exemplo, *Pseudoterranova decipiens* Krabbe, 1878, *Contraecaecum osculatum* Rudolphi, 1802, *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) e *H. fabri* (Rudolphi, 1819) (NASCETTI et al., 1986; PAGGI et al., 1991; ORECCHIA et al., 1994; MARTÍN-SANCHEZ et al., 2003). Conhecer o (s) hospedeiro (s) definitivo (s) e ampliar a geografia do estudo iria trazer mais informações sobre *H. deardorffoverstreetorum*.

Estudos tem demonstrado que dados gerados a partir de ITS rDNA e *cox-2* mtDNA são excelentes para a correta identificação de nematoides anisacuídeos, tanto para ovos, larvas e adultos (ZHU et al., 1998; YAO et al., 2010; MATTIUCCI et al., 2010). Cabe ressaltar que o DNA mitocondrial acumula substituições muito mais rápidas que o DNA ribossomal e apresenta amplo polimorfismo intraespecífico (AVISE, 2000; BLOIN, 2002). Estas variações genéticas intraespecíficas já foram relatadas em outros gêneros da família Anisakidae (SANTORO et al., 2010), porém essas variações foram bem suportadas com outras informações da espécie estudada. O fato de não existir a descrição morfológica e dados genéticos dos adultos de *H. deardorffoverstreetorum* gera algumas dúvidas em relação a esta espécie.

Não há um aceite padrão de um nível de variação molecular que deve ser considerado para igualar ou diferenciar espécies (NOLAN; CRIBB, 2005), pois esta área certamente ainda está em evolução (NADLER; PÉREZ- PONCE de LEÓN, 2011), sendo assim é importante a utilização da taxonomia clássica juntamente com as ferramentas moleculares avançadas para obter uma maior confiabilidade dos dados. Conclusões baseadas em apenas um padrão podem levar a possibilidade ao erro.

O morfotipo III em análise de ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA mostrou com confiança que a larva de quarto estágio (L4) de *Hysterothylacium* sp. coletada em *Sarda sarda* é a mesma espécie que a larva de quarto estágio (L4) encontrada em *Priacanthus arenatus*. Essa espécie foi separada em um clado distinto das demais que foram utilizadas para análise filogenética em dados de rDNA. A análise de *cox-2* mtDNA este morfotipo mostrou alta similaridade com *H. pelagicum* Deardorff & Overtreet, 1982 indicando que este morfotipo provavelmente pode pertencer à esta espécie. A variação genética deve ser verificada para confirmar se são a mesma espécie ou não, sendo assim, primariamente optamos por manter a identificação em nível de gênero. A morfologia dos adultos de *H. pelagicum*, principalmente a região posterior, não se assemelha com as larvas do morfotipo III. Vale ressaltar que o hospedeiro tipo de *H. pelagicum* é o *Coryphaena hippurus*, vulgarmente conhecido como dourado, e também ocorre no litoral do Brasil (DEARDORFF; OVERSTREET, 1981; FROESE, PAULY, 2004). Sendo assim, é necessário avaliar mais detalhadamente a análise molecular deste morfotipo.

As larvas do morfotipo III assemelham-se principalmente na região posterior com larvas encontradas por Fontenelle (2013) e identificadas como *H. fortalezae* Klein, 1973 em *Selene setapinnis* (Mitchill, 1815) em estudo apenas de cunho morfológico. De fato, a cauda destas larvas assemelha-se com a cauda de adultos desta espécie. Porém, a análise molecular deste morfotipo não mostrou alta similaridade com *H. fortalezae*. Evidenciando que identificar especificamente as larvas de nematoides anisacuídeos apenas utilizando metodologia morfológica pode levar ao erro.

O morfotipo IV mostrou com confiança que esta espécie pertence a um clado distinto bem suportado em comparação com as espécies com sequências depositadas no GenBank a partir de dados de ITS.

Este morfotipo assemelha-se com larvas de quarto estágio identificadas como *Hysterothylacium aduncum* Rudolphi, 1802 descritas a partir de várias espécies de peixes teleosteos no Mediterrâneo Ocidental e em um peixe herbívoro *Siganus fuscescens* Houttuyn,

1782 na costa de Taiwan, noroeste do Pacífico (PETTER; MAILARD, 1988; SHIH; JENG, 2002). De fato, o morfotipo IV assemelha-se com adultos de *H. aduncum*, principalmente pelas formações quitinosas semelhantes a espinhos encontrados na extremidade da cauda. Porém outras características importantes para a identificação, como por exemplo, as papilas nos machos não estão desenvolvidas nas larvas. A análise molecular não mostrou similaridade deste morfotipo com *H. aduncum*, indicando que nem mesmo larvas de quarto estágio devem ser associadas com adultos utilizando apenas ferramentas morfológicas. A morfologia das larvas pode ou não ser parecida com a dos adultos (SHAMSI et al., 2013). A análise de ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA não foi possível devido a problemas no alinhamento das fitas de DNA sequenciadas deste morfotipo, sendo necessária uma nova análise a fim de fornecer dados mais robustos deste morfotipo.

Larvas de terceiro estágio foram encontradas em 7 diferentes hospedeiros, enquanto as larvas de quarto estágio foram encontradas em apenas 2. Esses resultados sugerem menor especificidade de hospedeiro para L3 e maior especificidade para L4, assim como sugerido por Shamsi et al., (2013). As larvas encontradas em *Z. conchifer* e em *P. arenathus* não mostraram alta similaridade com os adultos coletados nesses mesmos hospedeiros, sendo assim, a caracterização genética das larvas de *H. spirale* continua desconhecida.

Os resultados mostram que o conhecimento das larvas de *Hysterothylacium* spp. no litoral do Brasil é bastante limitado e ao redor do mundo também. Muitos trabalhos mesmo em análise molecular não conseguem identificar especificamente as larvas. Atualmente, somente as larvas de *H. geschei* Torres, Andrade & Silva, 1998, *H. patagonense* Moravec, Urawa & Coria, 1997, *H. cenotae* (Pearse, 1936), *H. aduncum*, *H. longilabrum* Li, Liu & Zhang, 2012, e *H. zhoushanense* Li, Liu & Zhang, 2012, foram identificadas e descritas com precisão através de estudos moleculares (GUO et al., 2014). Qualquer identificação específica para larvas deste gênero, assim como os outros anisacídeos, apenas utilizando ferramentas morfológicas é inconsistente.

As espécies descritas mais recentemente deveriam incluir dados moleculares, visto que essas ferramentas estão mais acessíveis atualmente. Ainda que sequenciar genes parciais aumente a despesa e o tempo dos estudos taxonômicos, as recompensas são potencialmente ricas. O futuro de abordagens morfológicas e moleculares parece ser brilhante (BRAY; CRIBB, 2014). No caso do gênero *Hysterothylacium* isto iria contribuir para melhor classificação das espécies, assim como melhor compreensão sobre os aspectos relacionados aos seus ciclos de vida e ecologia.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- Estudos de nematoides anisquídeos devem ser realizados utilizando ferramentas morfológicas e moleculares de maneira integrada para a aquisição de resultados mais robustos. Pois conclusões baseadas apenas em um padrão leva a possibilidade de erro seja na taxonomia ou filogenia.
- Atualmente, estudos relacionados à taxonomia de Anisakidae são escassos no Brasil. Diante tamanha diversidade de hospedeiros que ocorrem no litoral, novos estudos devem ser realizados para ampliar o conhecimento sobre esses nematoides. Em especial, sobre os adultos dos gêneros *Raphidascaris* e *Hysterothylacium*.
- Os escassos trabalhos filogenéticos entre espécies do gênero *Hysterothylacium* abrangem poucos táxons. Isso evidencia o quanto a sistemática do grupo necessita ser estudada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, N. Molecular and morphological identification of helminthes found in Japanese smelt, *Hypomesus transpacificus nipponensis*, with notes on new host records of *Eustrongylides ignotus* and *Raphidascaris gigi*. **Acta Parasitologica**, v. 56, n. 2, p. 227–231, 2011.
- ABOLLO, E.; GESTAL, C.; PASCUAL, S. *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. **Parasitology Research**, v. 87, n. 6, p. 492–499, 2001.
- ANDERSON, R. C. Nematode parasites of vertebrates 2nd Edition: Their development and transmission. CAB Publishing, London, U.K., 672 p, 2000.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, E. W.; E LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p 403–410, 1990.
- AMATO-NETO, V.; AMATO, J. G. P.; AMATO, V. S. Problable recognition of human anisakiasis in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 261–262, 2007.
- ANSHARY, H.; SRIWULAN; FREEMAN, MARK, A.; OGAWA, K. Occurrence and Molecular Identification of *Anisakis* Dujardin, 1845 from Marine Fish in Southern Makassar Strait, Indonesia. **Korean Journal of Parasitology**, v. 52, n. 1, p. 9–19, 2014.
- ARAI, T.; AKAO, N.; EKIT, S.; KUMAGAI, T.; ISHIKAWA, H.; OHTA, N.; HIRATA, N.; NAKAJI, S.; YAMAUCHI, K.; HIRAI, M.; SHIRATORI, T.; KOBAYASHI, M.; FUJII, H.; ISHII, E.; NAITO, M.; SAITOH, S.; YAMAGUCHI, T.; SHIBATA, N.; SHIMO, M. e TOKIWA, T. Molecular Genotyping of *Anisakis* larvae in Middle Eastern Japan and endoscopic evidence for preferential penetration of normal over atrophic mucosa. **Plos One**, v. 9, n. 2, p 89188, 2014.
- ARIZONO, N.; YOSHIMURA, Y.; TOHZAKA, N.; YAMADA, N.; TEGOSHI, T.; ONISH, K.; UCHIKAWA, M. Ascariasis in Japan : Is pig-derived *Asacris* infecting human? **Japanese journal of infectious diseases**, v. 63, n. 6, p. 447–448, 2010.
- AUDICANA, M. T.; ANSOTEGUI, I. J.; CORRES, L. F.; KENNEDY, M. W. *Anisakis simplex*: dangerous dead and alive? **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 1, p. 20–25, 2002.
- AUDICANA, M. T.; KENEDDY, M. W. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 360–379, 2008.
- AVISE, J. C. Phylogeography: The History and Formation of Species. **Harvard University Press**, Cambridge, Massachusetts, 2000, 464p.
- BARROS, L. A.; FILHO, J. M.; OLIVEIRA, R. L. Nematoides com potencial zoonótico em peixes com importância econômica provenientes do rio Cuiabá. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 55–57, 2006.

BELLISIO, N. B.; ROGELLO, L. B.; TORNO, E. A. Peces marinos patagonicos. Buenos Aires, Ministerio de Economia, Secretaria de Estado de Intereses Maritimos. **Subsecretaría de pesca**, Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, 279p, 1979.

BERLAND, B. Nematodes from some Norwegian marine fishes. **Sarsia**, v. 2, p. 1–50, 1961.

BICUDO, A. J. A.; TAVARES, L. E. R.; LUQUE, J. L. Larvas de Anisakidae (Nematoda: Ascaridoidea) parasitas da cabrinha *Prionotus punctatus* (Bloch, 1793) (Osteichthyes: Triglididae) do litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 3, p 109–118, 2005.

BILLINGS, A. N.; YU, X.; TEEL, P. D.; WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group rickettsia in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 4, p. 474–478, 1998.

BIZERRIL, C.R.S.F.; COSTA, P. A. Peixes marinhos do estado do Rio de Janeiro. **Rio de Janeiro: Fundação de Estudos do Mar** – Femar, Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável do Estado do Rio de Janeiro, 2001.

BLAXTER, M. Molecular Systematics: Counting angels with DNA. **Nature**, v. 421, p. 122-124, 2003.

BLOIN, M. S. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 527-531, 2002.

BORGES, J. N.; CUNHA, L. F. G.; SANTOS, H. L. C.; MONTEIRO-NETO, C.; SANTOS, C. P. Morphological and molecular diagnosis of Anisakid nematode larvae from cutlassfish (*Trichiurus lepturus*) off the coast of Rio de Janeiro, Brazil. **Plos One**, v. 7, n. 7, p. 1–14, 2012.

BRAY, R. A.; CRIBB, T. H. Are cryptic species a problem for parasitological biological tagging for stock identification of aquatic organisms? **Parasitology**, v. 142, p. 125-133, 2014.

BRUCE, N. L.; CANNON, L. R. G. Ascaridoid nematodes from sharks from Australia and Solomon island, southeastern Pacific Ocean. **Invertebrate Taxonomy**, v. 4, p 763-784, 1990.

BRUCE, N. L.; ADLARD, R. D.; CANNON, L. G. R. Synoptic checklist of ascaridoid parasites (Nematoda) from fish hosts. **Invertebrate Taxonomy**, v. 8, n. 3, p. 583-674, 1994.

BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; e SHOSTAK, W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. Revisited. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 4, p 575–583, 1997.

CARVALHO-FILHO, A. Peixes da Costa Brasileira. **Melro**, São Paulo, 1999, 320p.

CAVALLERO, S.; NADLER, S.; PAGGI, L.; BARROS, N. B.; D'AMELIO, S. Molecular characterization and phylogeny of anisakid nematodes from cetaceans from southeastern

Atlantic coasts of USA, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. **Parasitology Research**, v. 108, n. 4, p. 781-792, 2011.

DASCHNER, A.; PASCUAL, C. Y. *Anisakis simplex*: sensitization and clinical allergy. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, v. 5, n. 3 p 281– 285, 2005.

DASCHNER, A.; CUÉLLAR, C.; RODERO M. The anisakis allergy debate: does an evolutionary approach help? **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 9–15, 2011.

DAMIN, L.; HEQING, H. *Heliconema minnanensis* n. sp. (Physalopteroidae: Physalopteridae) and *Raphidascaris trichiuri* (Yin and Zhang) n. comb. (Ascaridoidea: Anisakidae) in marine fishers. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 5, p. 1090-1094, 2001.

DEARDORFF, T. L.; OVERSTREET, R. M. North American species of *Goezia* (Nematoda: Anisakidae) from fishes. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 47, p 192–217, 1980.

DEARDORFF, T. L.; OVERSTREET, R. M. Review of *Hysterothylacium* and *Iheringascaris* (both previously *Thynnascaris*) (Nematoda: Anisakidae) from the northern Gulf of Mexico. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 93, n. 4, p 1035–1079, 1981.

DI AZEVEDO, M. I. N.; CARVALHO, V. L.; IÑIGUEZ, L. M. First record of the anisakid nematode *Anisakis nascettii* in the Gervais'beaked whale *Mesoplodon europaeus* from Brazil. **Journal of Helminthology**, *in Press*, 2014.

DI AZEVEDO, M. I. N.; KNOFF, M.; CARVALHO, V. L.; MELLO, W. N.; TORRES, E.; GOMES, D. C.; IÑIGUEZ, A. M. Morphological and Genetic Identification of *Anisakis paggiae* (Nematoda: Anisakidae) in Dwarf Sperm Whale *Kogia sima* (Owen, 1866) from Brazilian Waters. **Diseases of Aquatic Organisms**, *in Press*, 2015.

EKAU, W.; KNOPPERS, B. An introduction to the pelagic system of the North-East and East Brazilian shelf. **Archive of Fishery and Marine Research**, v. 47, n. 2- 3, p. 113–132, 1999.

ELÍAS, I.; BURGOS, G. Edad y crecimiento del “salmón del mar” *Pseudoperca semifasciata* (Cuvier, 1829) (Osteichthyes: Pinguipedidae) en aguas norpatagónicas argentinas. **Investigaciones Pesqueras**, v. 54, p. 533–548, 1988.

FELSENTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p 368–376, 1981.

FONTENELLE, G. Nematoides Anisakidae e Raphidascarididae em *Cynoscion guatucupa* (Cuvier, 1830) e *Selene setapinnis* (Mitchill, 1815) comercializados no Estado do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 58p, 2013.

FONTENELLE, G.; KNOFF M.; FELIZARDO, N. N.; LOPES, L. M. S.; SÃO CLEMENTE, S. C. Nematodes of zoonotic importance in *Cynoscion guatucupa* (Pisces) in the state of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 281–284, 2013.

FROESE, R.; PAULY, D. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org. Acesso em Janeiro de 2014.

GUO, Y. N.; XU, Z.; ZHANG, P.; HU, Y. H.; LI, L. Occurrence of *Hysterothylacium* and *Anisakis* nematodes (Ascaridida: Ascaridoidea) in the tanaka's snailfish *Liparis tanakae* (Gilbert & Burke) (Scorpaeniformes: Liparidae). **Parasitology Research**, v. 113, n. 4, p. 1289–1300, 2014.

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

HARTWICH, G. Keys to genera of the Ascaridoidea, In: ANDERSON, R.C.; CHABAUD, A. G.; WILLMOT, S. (eds.) **CHI Keys to the nematode parasites of vertebrates**. Farnham Royal, Commonwealth Agriculture Bureau, v. 2, p. 1–15, 1974.

HODDA, M. Phylum Nematoda. Em: Zhang, Z.-Q. & Shear, W.A. (Eds) Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy. **Zootaxa**, v. 1668, p. 265–293, 2007.

HOCHBERG, N. S.; HAMER, D.H. Anisakidosis: Perils of the deep. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 7, p. 806–812, 2010.

IÑIGUEZ, A. M.; SANTOS, C. P.; VICENTE, A. C. P.; Genetic characterization of *Anisakis typica* and *Anisakis physeteris* from marine mammals and fish from the Atlantic ocean os Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3-4, p. 350–360, 2009.

IÑIGUEZ, A. M.; CARVALHO, V. L.; MOTTA, M. R. A.; PINHEIRO, D. C. S. N.; VICENTE, A. C. P. Genetic analysis of *Anisakis typica* (Nematoda: Anisakidae) from cetaceans of the northeast coast of Brazil: new data on its definitive hosts. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 3-4, p. 293–299, 2011.

JABBAR, A.; FONG, R. W. J.; KOK, K. X.; LOPATA, A. L.; GASSER, R. B.; BEREVIDGE, I. Molecular characterization of anisakid nematode larvae from 13 species of fish from Western Australia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p 247–253, 2012.

KIM, W. S.; JEON, C. H.; KIM, J. H.; KIM, D. H.; OH, M. J. Current status of anisakid nematode larvae infection in marine fishes caught from the coastal area of Korea between 2010 and 2012. **Journal of Fish Pathology**, v. 25, n. 3, p. 189–197, 2012.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p 111–120, 1980.

KLIMPEL, S.; PALM, H. W.; RUCKERT, S.; PIATKOWSKI, U. The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian Deep (northern North sea). **Parasitology Research**, v. 94, n. 1, p. 1–9, 2004.

KLIMPEL, S.; PALM, H. W. Anisakid nematode (Ascaridoidea) life cycles and distribution: increasing zoonotic potential in the time of climate change? *In Progress in Parasitology*, Vol. 2, Parasitology Research Monographs, H. Mehlhorn (ed.) Springer Verlag. **Parasitology Research**. Monographs, v. 2, p 201–222, 2011.

- KNOFF, M.; FELIZARDO, N. N.; IÑIGUEZ, A. M., MALDONADO Jr; A; TORRES, R. M. Genetic and morphological characterization of a new species of the genus *Hysterothylacium* (Nematoda) from *Paralichthys isosceles* Jordan, 1890 (Pisces: Teleostei) of the Neotropical Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p 186–193, 2012.
- KOINARI, K.; KARL, S.; ELLIOT, A.; RYAN, U.; LYMBERY, A. J. Identification of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) in marine fish hosts from Papua New Guinea. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 1-3, p. 126–133, 2013.
- KUNH, T.; GARCÍA-MÁRQUEZ, J.; KLIMPEL, S. Adaptive radiation within marine anisakid nematodes: a zoogeographical modeling of cosmopolitan, zoonotic parasites. **Plos One**, v. 6, p. e28642, 2011.
- KUNH, T.; HAILER, F.; PALM, H. W.; KLIMPEL, S. Global assessment of molecularly identified *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) in their teleost intermediate hosts. **Folia Parasitologica**, v. 60, n. 2, p 123–134, 2013.
- YAO, H.; SONG, J. Y.; LIU, C.; LUO, K.; HAN, J. P.; LI, Y.; PANG, X. H.; XU, H. X.; ZHU, Y. J.; XIAO, P. G.; CHEN, S. L. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. **Plos One** v. 5, n. 10, p 1–9, 2010.
- LI, L.; LIU, Y. Y.; ZHANG, L. P. Morphological and molecular identification of *Hysterothylacium longilabrum* sp. nov. and larvae of different stages (Nematoda: Anisakidae) from marine fishes in the South China Sea. **Parasitology Research**, v. 111, n. 2, 767–777, 2012a.
- LI, L.; LIU Y. Y.; ZHANG L. P. Morphological and genetic characterization of *Hysterothylacium zhoushanensis* sp. nov. (Ascaridida: Anisakidae) from the flatfish *Pseudorhombus oligodon* (Bleeker) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) in the East China Sea. **Parasitology Research**, v. 111, n. 6, p. 2393–2401, 2012b.
- LOPEZ, R. B. Problemas sobre la distribución geográfica de los peces marinos sudamericanos. **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia (Hidrobiología)**, v.1, n. 3 p. 111–135, 1963.
- LUQUE, J. L.; FELIZARDO, N. N.; TAVARES, L. E. R. Community ecology of the metazoan parasites of namorado sandperches, *Pseudoperca numida* Miranda-Ribeiro, 1903 and *P. semifasciata* Cuvier, 1829 (Perciformes: Pinguipedidae), from the coastal zone of the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 2, p 269–278, 2008.
- LUQUE, J. L.; AGUIAR, J. C.; VIEIRA, F. M.; GIBSON, D. I.; SANTOS, C. P. Checklist of Nematoda associated with the fishes of Brazil. **Zootaxa**, n. 3082, p 1–88, 2011.
- LUQUE, J. L.; POULIN, R. Metazoan parasite species richness in Neotropical fishes: Hotspots and the geography of biodiversity. **Parasitology**, v. 134, p. 865–878, 2007.
- MANN, G. Vida de los peces en aguas chilenas. **Ministerio de Agricultura y de la Universidad de Chile**, Santiago, 1954, 344 p.

MATTIUCII, S.; NASCETTI, G.; CIANCHI, R.; PAGGI, L.; ARDUINO, P.; MARGOLIS, L.; BRATTEY, J.; WEBB, S.; D'AMELIO, S.; ORECHIA, P. E BULLINI, L. Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 3, p. 401–416, 1997.

MATTIUCII, S.; NASCETTI, G.; PORTES-SANTOS, C.; COSTA, G.; DI BENEDETTO, A. P.; RAMOS, M.; ARGYROU, R.; CIANCHI, R.; BULLINI, L. Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): Larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). **Systematic Parasitology**, v. 51, n. 3, p. 159–170, 2002.

MATTIUCII, S.; NASCETTI, G. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. **Advances in Parasitology**, v. 66, p. 47–148, 2008.

MATTIUCCI, S.; PAOLETTI, M.; WEBB, S. C. *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. **Systematic Parasitology**, v. 74, n. 3, p. 199–217, 2009.

MATTIUCII, S.; FAZZI, P.; DE ROSA, A.; PAOLETTI, M.; MEGNA, A. S.; GLIELMO, A.; DE ANGELIS, M.; COSTA, A.; MEUCCI, C.; CALVARUSO, V.; SORRENTINI, I.; PALMA, G.; BRUSCHI, F.; NASCETTI, G. Anisakiasis and Gastroallergic Reactions Associated with *Anisakis pegreffii* Infection, Italy. **Emerging Infectious Diseases** www.cdc.gov/eid, v. 19, n. 3, 2013.

MATTIUCCI, S.; CIPRIANI, P.; WEBB, S. C.; PAOLETTI, M.; MARCER, F.; BELLISARIO, B.; GIBSON, D. I.; NASCETTI, G. Genetic and Morphological Approaches Distinguish the Three Sibling Species of the *Anisakis simplex* Species Complex, with a Species Designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). **Journal of Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 199–214, 2014.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; DÍAZ, M.; ARTACHO, M. E.; VALERO, A. Molecular arguments for considering *Hysterothylacium fabri* (Nematoda: Anisakidae) a complex of sibling species. **Parasitology Research**, v. 89, n. 3, p. 214–220, 2003.

McCLELLAND, G. Nematoda (roundworms). In: **Marine Parasitology**, Austrália, 2005, 565p.

MLADINEO, I.; SIMAT, V.; MILETIC, J.; BECK, R.; POLJAK, V. Molecular identification and population dynamic of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae Dujardin, 1845) isolated from the European anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) in the Adriatic Sea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 224–229, 2012.

MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste de Brasil III. Teleostei 2**. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1980, 90p.

MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste de Brasil V. Teleostei 4**. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985, 105p.

MENEZES, N. A.; FIGUEIREDO, J. L. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste de Brasil VI. Teleostei 5**. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000, 116p.

MYERS, B. J. Research then and now on the Anisakidae nematode. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 95, p. 137-142, 1976.

MORAVEC, F. Nematodes of freshwater fishes of the Neotropical Region. **Academia**, Branisovská, České Budejovice, Czech Republic, 1998, 464p.

MORAVEC, F.; NAGASAWA, K. Some anisakid nematodes from marine fishes of Japan and the North Pacific Ocean. **Journal of Natural History**, v. 34, p. 1555-1574, 2000.

MORAVEC, F.; TARASCHEWSKI, H.; APPELHOFF, D.; WEYL, O. A new species of *Hysterothylacium* (Nematoda: Anisakidae) from the giant mottled eel *Anguilla marmorata* in South Africa. **Helminthologia**, v. 49, n. 3 p. 174–180, 2012.

MOTA, M. Extração de nemátodes do solo e de tecidos vegetais. **Relatório para aula prática de Biologia do Solo**, Universidade de Évora, 1989.

MURATA, R.; SUZUKI, J.; SADAMASU, K.; KAI, A. Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Beryx splendens* from Japanese Waters. **Parasitology International**, v. 60, p. 193–198, 2011.

NADLER, S. A.; HUDSPETH, E. S. S. Phylogenetic of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on tree genes and morphology: Hypotheses of structural and sequence evolution. **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 2, p. 380–393, 2000.

NADLER, S. A.; D'AMELIO, S.; DALEY, M. D.; PAGGI, L.; SIU, S.; SAKANARI, J. A. Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova* and *Contracaecum* from northern Pacific marine mammals, **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 6, p. 13–29, 2005.

NADLER, S. A.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. **Parasitology**, v. 138, p. 1688–1709, 2011.

NASCETTII, G.; PAGGI, L.; ORECCHIA, P.; SMITH, J. W.; MATTIUCCI, S.; BULLINI, L. Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North-East Atlantic. **International Journal of Parasitology**, v. 16, p. 633-640, 1986.

NAWA, Y.; HATZ, C.; BLUM, J. Sushi delights and parasites: the risk of fishborne and foodborne parasitic zoonoses in Asia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 9, p. 1297–1303, 2005.

NOLAN, M.J.; CRIBB, T.H. The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. **Advances in Parasitology**, v. 60, p. 101–163, 2005.

ORECCHIA, P.; MATTIUCCI, S.; D'AMELIO, S.; PAGGI, L.; PLOTZ, J.; CIANCHI, R.; NASCETTII, G.; ARDUINO, P.; BULLINI, L. Two new members in the *Contracaecum*

osculatum complex (Nematoda, Ascaridoidea) from the Antarctic. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 3, p. 367–377, 1994

PAGGI, L.; NASCETTI, G.; CIANCHI, R.; ORECCHIA, P.; MATTIUCCI, S.; D'AMELIO, S.; BERLAND, B.; BRATTEY, SMITH, J. W.; BULLINI, L. Genetic evidence for three species within *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) in the North Atlantic and Norwegian and Barents Seas. **International Journal for Parasitology**, v. 21, p. 195–212, 1991

PARK, J. K.; TAHERA, S.; SANG-HWA, L.; KANG, S.; HYONG, K. K.; MIN, G. S.; EOM, K. S.; NADLER, S. A. Monophyly of clade III nematodes is not supported by phylogenetic analysis of complete mitochondrial genome sequences. **BMC Genomics**, v. 3, n. 12, 392, 2011.

PEKMEZCI, G. Z.; YARDIMCI, B.; ONUK, E. E.; UMUR, S. Molecular characterization of *Hysterothylacium fabri* (Nematoda: Anisakidae) from *Zeus faber* (Pisces: Zeidae) caught off the Mediterranean coasts of Turkey based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. **Parasitology International**, v. 116, p. 127–131, 2014.

PETTER, A. J.; MAILLARD, C. Larves d'ascarides parasites de poissons en Méditerranée occidentale. **Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle**, v. 10, n. 2, p. 347–369, 1988.

QUIAZON, K. M.; SANTOS, M. D.; YOSHINAGA, T. *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) of Dwarf Sperm Whale *Kogia sima* (Owen, 1866) stranded off the Pacific coast of southern Philippine archipelago. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 1-2, p. 221–230, 2013.

RAFFEL, T. R.; ANDERSON, T. K. A new species of *Hysterothylacium* (Nematoda: Anisakidae) from the stomach of the red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens*, from Pennsylvania fishless ponds. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 6, p. 1503–1506, 2009

ROSA, I. L.; ROSA, R. S. Systematic revision of the South American species of Pinguipedidae (Teleostei, Trachinoidei). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 14, n. 4, p. 845–865, 1997.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. Invertebrate Zoology. 6ed. Fortworth, Texas, USA: **Harcourt Brace College Publishers**, 1993, 928 p.

SAAD, C. D. R.; VIEIRA, F. M.; LUQUE, J. L. Larvae of Anisakidae Skrjabin & Karokhin, 1945 (Nematoda, Ascaridoidea) in *Lophius gastrophysus* Miranda-Ribeiro, 1915 (Actinopterygii, Lophiidae) from the coastal zone of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Neotropical Helminthology**, v. 6, n. 2 p 159–177, 2012.

SAKANARI, J. A.; McKERROW, J. H. Anisakiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, n. 3, p. 278–284, 1989.

SANTORO, M.; MATTIUCCI, S.; PAOLETTI, M.; LIOTTA, A.; UBERTI, B. D.; GALIERO, G.; NASCETTI, G. Molecular identification and pathology of *Anisakis pegreffii*

(Nematoda: Anisakidae) infection in the Mediterranean loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). **Veterinary Parasitology**, v. 174, p. 65–71, 2010.

SCHAEFER, S.A. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidea: Loricariidae). In LR Malabarba, RE Reis, RP Vari, ZMS Lucena, CAS Lucena (1 ed), Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. **Edipucrs**, p. 375–400, 1998.

SETYOBUDI, E.; JEON, C. H.; LEE, C. H.; SEONG, K. B.; KIM, J. H. Occurrence and identification of *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) isolated from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Korea. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 585–593, 2011.

SHAMSI, S., GASSER, R.; BREVERIDGE, I. Description and genetic characterization of *Hysterothylacium* (Nematoda: Raphidascarididae) larvae parasitic in Australian marine fishes. **Parasitology International**, v. 62, p. 320–328, 2013.

SHIH, H. H.; JENG, M. S. *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) Infecting a Herbivorous Fish, *Siganus fuscescens*, off the Taiwanese Coast of the Northwest Pacific. **Zoological studies**, v. 41, n. 2, p. 208–215, 2002.

SMITH, J. D. Taxonomy of *Raphidascaris* spp. (Nematoda, Anisakidae) of fishes, with a redescription of *R. acus* (Bloch, 1772). **Canadian Journal of Zoology** v. 62, n. 4, p. 685–694, 1984.

SMITH, J. D.; WOOTEN, R. *Anisakis* and Anisakiasis. **Advances in Parasitology**, v. 16, p. 93–163, 1978.

SMRZLIC, V.; VALIC, D.; KAPETANOVIC, D, KURTOVIC, B; TESKEREDZIC, E. Molecular characterization of Anisakidae larvae from fish in Adriatic Sea. **Parasitology Research**, v. 111, n. 6, p. 85–91, 2012.

SUZUKI, J.; MURATA, R.; HOSAKA, M.; ARAKI, J. Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. **International Journal of Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 88–93, 2010.

SZPILMAN, M. Peixes Marinhos do Brasil: Guia Prático de Identificação. **Mauad**, Rio de Janeiro, 2000, 288p.

TAMURA, K; PETERSON, D.; PETERSON, N; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731–2739, 2011.

TAVARES, L. E. R.; J. L. LUQUE. Sistemática, biologia e importância em saúde coletiva de larvas de Anisakidae (Nematoda: Ascaridoidea) parasitas de peixes ósseos marinhos do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. In Silva-Souza, A. T. **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**, Abrapoa, Maringá. 2006, 387 p.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-

specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

TIMI, J. T.; LANFRANCHI, A. L.; ETCHEGOIN, J. A.; CREMONTE, F. Parasites of the Brazilian sandperch *Pinguipes brasiliensis* Curvier: A tool for stock discrimination in the Argentina sea. **Journal of Fish Biology**, v. 72, n. 6, p. 1332–1342, 2008.

TIMI, J. T.; LANFRANCHI, A. L.; LUQUE, J. L. Similarity in parasite communities of the teleost fish *Pinguipes brasiliensis* in the southwestern Atlantic: Infracommunities as a tool to detect geographical patterns. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 2, p. 243–254, 2010.

VAN THIEL, P. H.; KUIPERS, F. C.; ROSKAM, R. T. H. A nematode parasitic to herring causing acute abdominal syndromes in man. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 2, p. 97–113, 1960.

VICENTE, J. J.; RODRIGUES, H. O.; GOMES, D. C. Nematoides do Brasil. 1ª parte: nematoides de peixes. **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, v. 25, p. 1–79, 1985.

WILLIAMS, H.; JONES, A. Parasitic Worms of Fish. **Taylor & Francis**, London, 1994, 593p.

WRIGTH, K. A. Nematoda. *Microscopy Anatomic*, v. 4, Aschemilthes, Editado por Harrison, F. W. e Ruppert, E. E, p. 111–195, **Wiley-Liss**, Nova Iorque, 1991.

XU, Z.; LIANG, L.; ZHANG, L. P. *Hysterothylacium gibsoni* sp. nov. and *H. tetrapteri* (Bruce & Cannon, 1989) (Nematoda: Ascaridida) from the Chinese marine fishes. **Acta Parasitologica**, v. 59, n. 2, p. 323–330, 2014.

ZHU, X. Q.; GASSER, R. B.; PODOLSKA, M.; CHILTON, N. B. Characterization of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. **International Journal of Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 1911–1921, 1998.