

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

DISSERTAÇÃO

Diagnóstico de parasitos de peixes Perciformes: Uma espécie de *Ergasilus* (Copepoda: Ergasilidae) e duas espécies de *Encotyllabe* (Monogenea: Capsalidae)

Naraiana Lopes Taborda

2015



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

**DIAGNÓSTICO DE PARASITOS DE PEIXES PERCIFORMES: UMA ESPÉCIE DE
ERGASILUS (COPEPODA: ERGASILIDAE) E DUAS ESPÉCIES DE *ENCOTYLLABE*
(MONOGENEA: CAPSALIDAE)**

Naraiana Lopes Taborda

Sob a Orientação do Professor
José Luis Fernando Luque Alejos

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

Seropédica, RJ
Dezembro de 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

597

T114d

T

Taborda, Naraiana Lopes, 1991-

Diagnóstico de parasitos de peixes Perciformes: uma espécie de *Ergasilus* (Copepoda: Ergasilidae) e duas espécies de *Encotyllabe* (Monogenea: Capsalidae) / Naraiana Lopes Taborda. - 2015.

41 f.: il.

Orientador: José Luis Fernando Luque Alejos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2015.

Bibliografia: f. 36-41.

1. Peixe - Parasito - Teses. 2. Parasito - Morfologia - Teses. 3. Copépode - Teses. 4. Monogenea - Teses. I. Luque Alejos, José Luis Fernando, 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

NARAIANA LOPES TABORDA

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

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

Anderson Dias Cezar. Ph.D. UCB

Dimitri Ramos Alves. Ph.D. UniFOA

Luis Cláudio Muniz Pereira. Ph.D. FIOCRUZ

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à toda minha família, aos meus pais Orlando e Maria das Graças, ao meu irmão Diego e ao meu namorado Yuri que me deram todo o suporte e incentivo para esta conquista.

AGRADECIMENTOS

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

Ao meu orientador Prof. Dr. José Luis Fernando Luque Alejos, pela oportunidade, ensinamentos e confiança que tornaram esse projeto possível.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia de Peixes da UFRRJ, Camila Pantoja, Juliana Moreira, Fabiano Paschoal, Fabiano Vieira, Philippe Vieira, Íris Soares, Letícia Gabriela, Carla Juliete, Vivian Suane, Felipe Bisaggio, Fernanda Cunha e Vanessa Paschoal pela companhia diária, auxílio de modo totalmente prestativo e amizade.

À Camila Pantoja por me auxiliar nas análises filogenéticas e pela amizade.

Ao Fabiano Paschoal por todo auxílio e ensinamento no estudo sobre a espécie de *Ergasilus*.

Ao Dr. Tomáš Scholz, do Instituto de Parasitologia de České Budějovice, República Tcheca, pelo ensino, pelas sugestões e revisão do primeiro capítulo.

Ao Dr. Gerardo Pérez Ponce de Leon, do Instituto de Biología da Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), que recebeu a mim e a Camila Pantoja no México de modo atencioso e cuidadoso com nossa estadia, sempre com muitos ensinamentos nos deu todo o suporte para concretização do estudo molecular.

Ao David Hernandez pela amizade, ensinamentos e auxílio com a biologia molecular e a todos do Instituto de Biología da UNAM que nos receberam com muita alegria.

A minha família que sempre me apoiou e incentivou a estudar, que cuida de mim com paciência, amor e confiança.

Ao meu namorado Yuri por sempre me apoiar, incentivar, cuidar e estar ao meu lado com amor.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

TABORDA, NARAIANA LOPES. **Diagnóstico de parasitos de peixes Perciformes: Uma espécie de *Ergasilus* (Copepoda: Ergasilidae) e duas espécies de *Encotyllabe* (Monogenea: Capsalidae).** 2015. 48p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2015.

O presente trabalho teve como objetivo ampliar os conhecimentos sobre a biodiversidade de parasitos de peixes, visto o escasso conhecimento para alguns grupos. No capítulo 1 objetivamos a descrição de uma nova espécie do copépode parasito *Ergasilus* von Nordmann, 1832, encontrado parasitando as brânquias de duas espécies de ciclídeos, *Geophagus argyrostictus* Kullander, 1991 (espécie tipo) e *G. altifrons* Heckel, 1840, capturados no Rio Xingu em torno de Altamira, Estado do Pará, Brasil. A nova espécie é o primeiro registro do gênero *Ergasilus* encontrado em peixes *G. argyrostictus* e *G. altifrons*. No capítulo 2, espécies de *Encotyllabe* encontradas em hospedeiros Perciformes foram analisadas através do estudo molecular, com análise do gene citocromo c oxidase I (COI) e morfológico. Estes dados identificam duas espécies novas, uma parasita de *Pagrus pagrus* (Sparidae) e outra de *Orthopristis ruber* (Haemulidae) e a adição da sequência de DNA mitocondrial para *E. souzalimae* Carvalho e Luque, 2012.

Palavras-chave: Biodiversidade, *Ergasilus*, *Encotyllabe*.

ABSTRACT

TABORDA, NARAIANA LOPES. **Parasites diagnostic fish Perciformes: one species of *Ergasilus* (Copepoda: Ergasilidae) and two species of *Encotyllabe* (Monogenea: Capsalidae).** 2015. 48p. 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 increase the knowledge of biodiversity of parasite of fishes, unknown to some groups. In Chapter 1 the aim was described the new species ergasilid copepod *Ergasilus* von Nordmann, 1832, found on the gills of two cichlid fishes, *Geophagus argyrostictus* Kullander, 1991 (type host) and *G. altifrons* Heckel, 1840, caught in the Xingu River around Altamira, State of Pará, Brazil. The new species is the first record of genus *Ergasilus* found on fishes *G. argyrostictus* e *G. altifrons*. In Chapter 2, species of *Encotyllabe* Perciformes host were analyzed by molecular study, with analysis of cytochrome c oxidase I gene (COI) and morphological study. These data identify two new species, a parasite of *Pagrus pagrus* (Sparidae) and other of *Orthopristis ruber* (Haemulidae), and addition of the sequence mitochondrial DNA to *E. souzalimae* Carvalho e Luque, 2012.

Key words: Biodiversity, *Ergasilus*, *Encotyllabe*.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Similaridade genética entre espécies de *Encotyllabe* depositadas no GenBank e as apresentadas no presente estudo. (*) Sequências obtidas no presente estudo 37

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - *Ergasilus* sp. nov. fêmea adulta de *Geophagus argyrostictus*. **A** – Vista dorsal do espécime inteiro; **B** – antena, ventral; **C** – Peças bucais, ventral; **D** – antênula, ventral. 14

Figura 2 - *Ergasilus* sp. nov. fêmea adulta de *G. argyrostictus*. **A** – abdômen e ramo caudal, ventral; **B** – Saco ovífero, dorsal; **C** – Pata 5, ventral; **D** – placas interpodais das patas 1 a 4 (numeradas de I a IV), ventral. 15

Figura 3 - *Ergasilus* sp. fêmea adulta de *G. argyrostictus*. **A** – pata 1, ventral; **B** – pata 2, ventral; **C** – pata 3, ventral; **D** – pata 4, ventral..... 16

CAPÍTULO II

Figura 1 *Encotyllabe* sp. nov. 1 de *Pagrus pagrus*. **A** – vista ventral; **B** – sistema reprodutor; **C** – ganchos; **D** – âncora menor; **E** – âncora maior..... 29

Figura 2 *Encotyllabe* sp. nov. 2 de *Orthopristis ruber*. **A** – vista ventral; **B** – sistema reprodutor; **C** – ovo; **D** – ganchos; **E** – âncora menor; **F** – âncora maior. 33

Figura 3 *Encotyllabe souzalimae*. **A** – ovo; **B** – âncora menor. 35

Figura 4 Árvore construída a partir do modelo PHYML com sequências de *Encotyllabe* spp. obtidas neste estudo a partir de dados mtDNA COI. *Neobenedenia* foi utilizado como grupo externo. 36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. CAPÍTULO I - NOVA ESPÉCIE DE <i>Ergasilus</i> VON NORDMANN, 1832 (COPEPODA: ERGASILIDAE) DE <i>Geophagus altifrons</i> HECKEL E <i>G. argyrostictus</i> KULLANDER (PERCIFORMES: CICHLIDAE) NA AMAZÔNIA BRASILEIRA.....	3
2.1. RESUMO.....	4
2.2. ABSTRACT	5
2.3. INTRODUÇÃO	6
2.4. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.5. RESULTADOS	8
2.6. DISCUSSÃO	11
3. CAPÍTULO II - ANÁLISE MORFOLOGICA E MOLECULAR DE DUAS ESPÉCIES DE <i>Encotyllabe</i> DIESING, 1850 (MONOGENEA: CAPSALIDAE), PARASITANDO PEIXES MARINHOS DO BRASIL.	15
3.1. RESUMO.....	16
3.2. ABSTRACT	17
3.3. INTRODUÇÃO	18
3.4. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.4.1. Fixação	20
3.4.2. Análise Morfológica	21
3.4.3. Análise Molecular	21
3.4.4. Extração de DNA	21
3.4.4.1. Reações em cadeia da polimerase (PCR) para COX mDNA	21
3.4.4.2. Determinação das sequências nucleotídicas	21
3.4.4.3. Análise computacional das sequências nucleotídicas	21
3.5. RESULTADOS	23
3.6. DISCUSSÃO	33
4. CONCLUSÕES GERAIS	35
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os parasitos são altamente diversos e numerosos quantitativamente, apresentam variadas adaptações morfológicas (POULIN, MOURAND 2000; POULIN 2014), porém quando se trata de biodiversidade deve-se compreender toda a variabilidade de vida, incluindo a variabilidade genética intraespécies, sendo considerada a expressão gerada pela interação entre a informação genética e a biosfera (POULIN, MOURAND 2000; NADLER, DE LEON, 2011).

A diversidade de espécies de parasitos tem sido estimada por diversos autores, porém segundo Poulin, Morand (2000) é impossível se ter uma previsão de quantas espécies existem visto que nem mesmos os hospedeiros vertebrados são conhecidos por completo, além de haver uma variação na distribuição dos parasitos (POULIN 2014). Outro fator que pode subestimar o número de espécies é a variabilidade fenotípica, segundo Poulin, Morand (2000) em geral esses indivíduos podem apresentar pequenas variações morfológicas ao parasitar diferentes hospedeiros, sendo esta variabilidade induzida pelo hospedeiro, além das espécies crípticas, nas quais são semelhantes morfológicamente e diferentes geneticamente. Este fator é considerado a hipótese do segundo capítulo do presente trabalho, ou seja, espécies do gênero *Encotyllabe* identificado em diversos hospedeiros podem ser o mesmo, porém apresentando variabilidade.

Com alta diversidade de hospedeiros, os peixes são os vertebrados com maiores índices de infecção de parasitos, de acordo com Almeida, Cohen (2011), devido ao ambiente que facilita a penetração do parasito, possuindo uma vasta e única fauna parasitária. Dentre esta fauna, monogenea e copépodes são os dois principais grupos em que afetam a piscicultura com perdas econômicas. Estudos taxonômico e da biologia contribuem para adequadas medidas de gestão e proteção de populações naturais Eiras *et al.* (2010). No presente trabalho estudamos espécies pertencente a esses dois distintos grupos, porém ambos fazem parte de uma parcela de parasitos de grande importância não somente econômica, como de conhecimento taxonômico.

Segundo Bush *et al.* (2007) 50000 espécies de crustáceos são conhecidas, sendo 3000 considerados parasitas encontrados em uma gama de hospedeiros desde cnidários, anelidas, equinodermos a vertebrados. Dentro desse grupo estão os copépodes, microcrustáceos com grande diversidade e diferentes estilos de vida seja livre compondo importante parte do zooplâncton ao parasitismo. Encontrados em diversos ambientes, abundantes em água doce, porém com maior diversidade em ambiente marinho. Copépodes de água doce são em sua maioria de vida livre, sendo aproximadamente 2814 de água doce, porém apenas 330 espécies são parasitos (BOXSHALL, DEFAYE 2008). Copépodes parasitos são os crustáceos mais diversos morfológicamente apresentado dimorfismo sexual e maiores variações nas estruturas de fixação, ausentes em outros crustáceos, esta variação pode aumentar a patogenicidade. Entre os copépodes parasitas de peixe a família Ergasilidae está entre as mais comuns e mais conhecidas, é a que possui maior riqueza entre os copépodes, encontrados em todo regime de salinidade, de água doce (maioria descrita), estuário a marinhos (exceto na Antártica) (BOXSHALL, 2008; THATCHER 1998). Ergasilídeos possuem um ciclo de vida complexo e único entre os copépodes que inclui estágios de náuplios de vida livre, copepoditos e fêmeas adultas fertilizadas parasita (ABDELHALIM, LEWIS, BOXSHALL 1991; BOXSHALL, DEFAYE 2008; BUSH *et al.* 2007). *Ergasilus* é o gênero conhecido como peste para piscicultura, abundantes são encontrados em sua maioria em peixes de água doce, em maior frequência na bacia Amazônica (THATCHER, BRASIL-SATO 2008; TAVARES-DIAS *et al.* 2015). Atualmente são conhecidas 33 espécies no Brasil e 186 espécies em todo o mundo (WALTER, BOXSHALL 2015). No presente trabalho propomos uma nova espécie para o

gênero, identificada ao parasitar ciclídeos *Geophagus argyrostictus* Kullander, 1991 (hospedeiro tipo) e *G. altifrons* Heckel, 1840, coletados no Rio Xingu, Pará.

Outro grupo parasita muito comum em peixes é monogenea, assim como copépodes possuem uma fauna altamente diversa, porém está longe de ser bem conhecida (MENDOZA-PALMERO *et al.* 2015). Grupo predominantemente ectoparasito, monoxenos de ciclo de vida simples, na qual as brânquias, as narinas, os olhos e a superfície corporal são os principais locais de infecção, aproximadamente 95% segundo Euzet e Combes (1998). Euzet e Combes (1998) ainda afirmam que em algumas circunstâncias a condição de endoparasito ou mesoparasito é mais atraente, tendendo o mesmo a se estabelecer em locais como bexiga urinária, cloaca, colón, estômago, cavidade visceral e até mesmo no coração.

Os monogenéticos são altamente específicos, Santos, *et al.* (2001) afirmam que dentre os parasitas este geralmente é o mais específico, uma vez que são capazes de selecionar o macroambiente, o hospedeiro, e neste seleciona o local ao qual se fixará. Porém têm-se relatos destes parasitos de uma mesma espécie adaptados a condições diversas, o esclarecimento sobre a especificidade, diversidade entre outras características estão sendo esclarecidas com a introdução da biologia molecular. Devido a esta ferramenta de estudo alterações de classificação já podem ser reconhecidas, desta forma algumas espécies tiveram sua posição taxonômica alterada e outras tiveram de ser criadas uma vez que há reavaliação das classificações taxonômicas (SHARMA, *et al.* 2011), há uma perspectiva de clareza na identificação devido a junção de ambas as técnicas, molecular e morfológica.

Objetivamos no presente trabalho diagnosticar uma espécie de *Ergasilus* no primeiro capítulo e no segundo três de *Encotyllabe* de diferentes hospedeiros para melhor conhecimento destes grupos, adentrando na problemática estabelecida para identificação do gênero *Encotyllabe* com o auxílio de métodos moleculares e morfológicos.

CAPÍTULO I

**NOVA ESPÉCIE DE *Ergasilus* VON NORDMANN, 1832 (COPEPODA:
ERGASILIDAE) DE *Geophagus altifrons* HECKEL E *G. argyrostictus* KULLANDER
(PERCIFORMES: CICHLIDAE) NA AMAZÔNIA BRASILEIRA.**

RESUMO

O copépode ergasilídeo, *Ergasilus* sp. nov., é descrito a partir de fêmeas encontradas parasitando as brânquias de dois ciclídeos, *Geophagus argyrostictus* Kullander, 1991 (hospedeiro tipo) e *G. altifrons* Heckel, 1840, da Amazônia Brasileira. A nova espécie pode ser distinguida dos congêneres pela combinação única das seguintes características: cefalotórax não inflado e ligeiramente constricto, primeiro segmento da antênula com três setas e maxílula ornamentada com três setas desiguais externas, a maxila contém uma grande sincoxa com uma seta próximo a base, primeira e quarta patas com endópode 3-segmentado e base do exópode da pata 2 contendo uma conspícua projeção abrupta. A presente espécie é a primeira do gênero *Ergasilus* von Nordmann, 1832 encontrada em ciclídeos do gênero *Geophagus* Heckel.

ABSTRACT

The ergasilid copepod, *Ergasilus* sp. nov., is described from females found on the gills of two cichlid fishes, *Geophagus argyrostictus* Kullander, 1991 (type host) and *G. altifrons* Heckel, 1840, from the Brazilian Amazon. The new species can be distinguished from congeners by the unique combination of the following characteristics: the cephalothorax is not inflated and is slightly constricted, the first antennular segment bears three setae and the maxillule three unequal outer setae, the maxilla contains a large syncoxa with one seta near its basis, first and fourth legs are with a 3-segmented endopod, and the base of the exopod in Leg 2 contains a conspicuous, bluntly-pointed projection. The present species is the first of genus *Ergasilus* von Nordmann, 1832 found on cichlids of the genus *Geophagus* (Heckel).

2.3. INTRODUÇÃO

Ergasilidae von Nordmann, 1832 é a maior família da ordem Cyclopoida Burmeister, 1835, com a maioria das espécies encontradas em peixes de água doce. Somente fêmeas adultas de ergasilídeos são parasitos de brânquias, nadadeiras, fossas nasais, embebido no tecido do hospedeiro ou na bexiga urinária de peixes actinoptérigeos, e raramente nas brânquias de elasmobrânquios e moluscos bivalves (KABATA, 1979; BOXSHALL e HALSEY, 2004; ROSIM, *et al.* 2013).

Ergasilídeos compreendem cerca de 270 espécies descritas distribuídos em 27 gêneros em todo mundo, com *Ergasilus* sendo o gênero mais rico em espécies contendo aproximadamente dois terços das espécies descritas para a família (BOXSHALL e MONTÚ, 1997; EL-RASHIDY e BOXSHALL, 2002; ROSIM *et al.* 2013). De acordo com Boxshall e Defaye (2008), a região Neotropical tem a segunda maior riqueza de copépodes global, com ergasilídeos representando cerca de 11 % da riqueza total (16 gêneros) nesta região. Entretanto, alguns autores assumem que somente uma pequena proporção de ergasilídeos existentes é atualmente conhecida (MONTÚ e BOXSHALL, 2002; ROSIM, *et al.* 2013; MARQUES, *et al.* 2015).

Vinte e duas espécies de água doce de *Ergasilus* são conhecidas das brânquias de teleóstes e uma espécie de arraia. Duas espécies de *Ergasilus* foram reportados de ciclídeos na região Neotropical, nomeada *E. coatiarus* Araújo e Varella, 1998 de *Cichla monoculus* (Bloch e Schneider, 1801), *C. orinocensis* (Humboldt, 1833) e *C. temensis* (Humboldt, 1821) na bacia amazônica, e *E. pitalicus* Thatcher, 1984 de *Cichlasoma* sp. no Rio Pital, Colômbia. Em adição, *Ergasilus* sp. tem sido reportado de *Cichlasoma trimaculatum* (Günther 1867) na Lagoa Tres Palos, Guerrero, México (THATCHER, 1984a; VIOLANTE-GONZÁLEZ, *et al.* 2008; MORALES-SERNA, *et al.* 2012; LUQUE, *et al.* 2013).

Durante a pesquisa parasitológica de metazoário parasitas de peixes de água doce na Amazônia brasileira, copépodes ectoparasitos do gênero *Ergasilus* foram encontradas em duas espécies de *Geophagus*, nomeadas *G. argyrostictus* Kullander, 1991 e *G. altifrons* Heckel, 1840 (Perciformes: Cichlidae). O estudo morfológico desses espécimes tem revelado que eles representam uma espécie ainda desconhecida de *Ergasilus*, na qual é descrita no presente estudo.

2.4. MATERIAL E MÉTODOS

Copépodes foram coletados de brânquias de *G. argyrostictus* e *Geophagus altifrons* capturados no Rio Xingu em torno de Altamira, Estado do Pará, Brasil (3°12'S, 52°12'W). As brânquias foram colocadas em placas de Petri com água de torneira e examinados para análise de copépodes usando microscópio estereoscópico. Os copépodes encontrados foram fixados e preservados em álcool 70%. Desenhos foram feitos com auxílio de microscópio Olympus BX53 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) equipado com tubo de desenho. As medidas são dadas em micrometro (μm), salvo indicação contrária e são apresentados intervalo de valores de espécimes do hospedeiro tipo, com dados de espécimes de *G. altifrons* em parênteses. A terminologia segue Boxshall e Halsey (2004). Os nomes científicos dos hospedeiros seguem Froese e Pauly (2015). Os espécimes-tipo serão depositados no Museu Nacional do Rio de Janeiro (UFRJ).

2.5. RESULTADOS

Ordem Cyclopoida Burmeister, 1835

Família Ergasilidae von Nordmann, 1832

Ergasilus sp. nov. (Figs. 1–3)

Fêmea adulta (baseado em 6 espécimes de *G. argyrostictus* e 2 espécimes de *G. altifrons*). Comprimento do corpo, da margem anterior do prossomo até a posterior do ramo caudal 797–834 (786–939). Corpo compreendendo prossomo e urossomo (Figura 1A); prossomo consistindo de cefalossomo com antênula e antena em vista dorsal e 4 pedigero somito. Cefalossomo e primeiro pedigero somito fundido. Cefalotórax mais longo que largo, 350–370 (350–379) de comprimento, 314–440 (317–327) de largura, não inflado e levemente constricto, com mais que a metade do comprimento do corpo. Urossomo consistindo de cinco pedigero somito, somito genital duplo, e 3 somitos abdominais livres; terceiro abdominal somito bipartido. Somito genital duplo (Figura 2A) mais largo que longo, 65–71 (73–82) de comprimento, 91–97 (77–95) de largura, com a superfície ventral ornamentada com 2 fileiras de agudos espinhos ao longo da margem posterior. Somitos abdominais livres decrescendo quanto a largura posteriormente; primeiro e segundo com comprimentos similares; somito anal bipartido, menor que os dois prévios. Margem posterior ventral dos somitos abdominais ornamentados com 2 fileiras de espinhos (primeiro e segundo somitos) ou uma fileira (somito anal).

Ramo caudal com comprimento similar ao somito anal; duas fileiras curvas de espinhos cônicos na superfície ventral estendendo-se próximo a margem posterior e medial; cada ramo armado com uma longa seta medial, 2 setas ventralmente e uma seta na parte externa. Dois sacos de ovos (Figura 2B), mais longos que largos, cada um composto por 2–4 fileiras de ovos.

Antênula 6-segmenta (Figura 1D), afilando distalmente, aestets presentes no terceiro, quinto e sexto segmento; fórmula setal: 3: 11: 5 + ae: 4: 2 + ae: 5 + ae; todas setas nuas. Antena compreendendo coxobase, endópode 3-segmentado com uma garra terminal curvada (Figura 1B). Coxobase pequena, mais larga proximalmente; membrana entre coxobase e primeiro segmento endopodal não inflado. Primeiro segmento endopodal 3× mais longo que a coxobase; armado com seta na margem interna. Segundo segmento endopodal levemente curvado 2× mais longo que a coxobase, armado com um espinho proximalmente e um distalmente na margem interna. Terceiro segmento endopodal pequeno, composto de uma garra tão longa quanto o segundo segmento endopodal.

Partes da boca compreendendo mandíbula, maxilula e maxila; maxilípede ausente (Figura 1C). Mandíbula não segmentado, compreendendo anterior, media e posterior lâmina; anterior pequena, com dentes ao longo da margem anterior; lâmina mediana e posterior com dentes ao longo da posterior margem. Maxilula pequena, compreendendo três setas de diferentes tamanhos na margem exterior. Maxila compreendendo segmento basal (sincoxa) com uma seta próximo à base; segundo segmento (base) compreendendo longos dentes anteriormente e uma seta espinulada localizado no meio da base.

Patás birremes 1-4 (Figura 3A–D) cada uma com 2-segmentos protopodes compreendendo coxa e base; placas interpodais (Figura 2D) com uma fileira de espinhos (patas 1 e 2) ou faltando espinhos (patas 3 e 4). Coxa de todas as patas com margens faltando espinhos. Base com seta presente na margem externa, posterior superfície de todas as patas, na margem interna com uma fileira de espinhos (patas 1 e 4) ou 2 fileiras (patas 2 e 3). Base da pata 2 com uma projeção com ponta abruptamente na base do exópode. Todas patas 3-segmentada, exceto 2-segmentada exópode da quarta pata. Margem externa de ambos ramos parcialmente ou

completamente coberta com fileira de espinhos. Endópode da pata 4 com uma fileira de espinhos na superfície posterior ventral de cada segmento. Margem interna do primeiro segmento exopodal das patas 2, 3 e 4 setulada.

Armadura das patas (espinhos, numeral romano; seta, numeral arábico):

	Coxa	Base	Exópode	Endópode
Pata 1	0-0	1-0	I-0; I-1; II-5	0-1; 0-1; II-4
Pata 2	0-0	1-0	I-0; 0-1; 0-6	0-1; 0-2; I-4
Pata 3	0-0	1-0	I-0; 0-1; 0-6	0-1; 0-2; I-4
Pata 4	0-0	1-0	I-0; 0-5	0-1; 0-2; I-3

Quinta pata (Figura 2C) curta, com uma seta na base do segmento livre, 2 setas localizadas distalmente (sub-apical levemente mais longa que a apical) e uma seta pequena lateralmente no segmento livre.

Macho: Desconhecido

Resenha taxonômica

Hospedeiro tipo: *Geophagus argyrostictus* Kullander, 1991.

Outro hospedeiro: *Geophagus altifrons* Heckel, 1840.

Sítio de infecção: Filamentos branquiais.

Localidade tipo: Rio Xingu, Altamira (3°12'S, 52°12'W), Estado do Pará, Brasil.

Data da coleta: 25 Abril 2013.

Prevalência: 18% em *Geophagus argyrostictus* (n = 11) e 6% em *Geophagus altifrons* (n = 16).

Intensidade média de infecção: 1,5 em *Geophagus argyrostictus* de 11,0 em *Geophagus altifrons*.

Comentários

Espécimes encontradas em duas espécies de *Geophagus* pertencentes ao gênero *Ergasilus* possuem: 1) Pata 4 birreme com exópode 2-segmentado e endópode 3-segmentado, (2) antênula 6-segmentado, (3) antena com uma única garra, (4) maxílula reduzida e (5) maxilípedes ausentes nas fêmeas (BOXSHALL e HALSEY, 2004; SUÁREZ-MORALES e SANTANA-PIÑEROS, 2008). A nova espécie, é caracterizada principalmente pela presença da primeira e quarta pata com endópode 3-segmentado e primeiro segmento da antênula com 3 setas. Das 22 espécies de *Ergasilus* parasitando peixes de água doce na região Neotropical, somente *E. colomesus* Thatcher e Boeger, 1983; *E. pitalicus* Thatcher, 1984; *E. trygonophilus* Domingues e Marques, 2010 e *E. sinefalcatus* Marques, Boeger e Brasil-Sato, 2015 tem a quarta pata com endópode 3-segmentado, mas somente *E. pitalicus* é encontrado em ciclídeos. Todas essas espécies podem ser facilmente separadas de *Ergasilus* sp. nov. por possuir o primeiro segmento da antênula com uma única seta e a primeira pata com endópode 2-segmentado endópode (THATCHER e BOEGER, 1983; THATCHER, 1984a; DOMINGUES e MARQUES 2010; MARQUES, *et al.* 2015), considerando que a nova espécie possui o primeiro segmento da

antênula com 3 setas e a primeira pata com endópode 3-segmentado. Outras espécies parasitando ciclídeos neotropicais, *Ergasilus coatiarus* tem a primeira pata com endópode 2-segmentado.

Uma espécie recentemente descrita, *E. sinefalcatus* de *Salminus franciscanus* (Lima e Britski, 2007) no Rio São Francisco, Brasil, tem também a primeira pata com endópode 2-segmentado e quarta pata com 3-segmentado, mas o número de setas no primeiro segmento da antênula presente na descrição morfológica difere da apresentada no desenho (ver Fig. 3 em Marques *et al.* 2015).

Deve notar-se que a presença da primeira e quarta pata com endópode 3-segmentado como observado na nova espécie, é também típica em sete espécies de água salobra de *Ergasilus* na América do Sul e *E. sieboldi* von Nordmann, 1832, uma espécie parasita cosmopolita de peixes de água doce (YAMAGUTI 1939; KABATA 1979; AMADO e ROCHA 2001). Entretanto, a nova espécie difere destes parasitas na presença de uma conspícua projeção abrupta na base do exópode na pata 2 e pela forma do cefalotórax, na qual não é inflado, mas levemente constricto. *Ergasilus* sp. nov. pode ser distinguido de todos, exceto *E. lizae* Kroyer 1863 na presença de uma seta na sincoxa na maxila, considerando que a nova espécie possui uma seta próximo a base.

Em adição, a nova espécie difere de *E. atafonensis* Amado e Rocha, 1995 de *Mugil curema* no Rio de Janeiro, Brazil e *E. orientalis* Yamaguti, 1939 de *Acanthogobius flavimanus* e *Atherina bleekeri* no Japão pela ausência de uma membrana inflada entre a coxobase e o primeiro segmento do endópode, de *E. bahiensis* Amado e Rocha, 1995 de *Mugil curema* na Bahia, Brasil e *E. sieboldi* Nordmann, 1832 por todas as coxas nuas, e de *E. parabahiensis* El-Rashidy e Boxshall, 1999 de *Agonostomus monticola* em Guiana pela maxila e maxílula faltando espinhos. Difere de *E. sergipensis* Amado e Rocha, 2001 no Sergipe, Brasil e *E. xenomelanirisi* Carvalho, 1955 de *Xenomelanirisi brasiliensis* em São Paulo, Brasil pela base ornamentada com uma fileira de espinhos na margem interna. A nova espécie pode ser distinguida de *E. lizae* de *M. liza* do U.S.A. pela ausência de espinhos em todas as coxas.

2.6. DISCUSSÃO

Atualmente, 774 espécies de copépodes, 189 espécies de isópodes e 133 espécies de branquiúros são conhecidos por parasitarem peixes marinhos e de água doce na região Neotropical (LUQUE e POULIN 2007; MORALES-SERNA *et al.* 2012). Um total de 1.338 associações hospedeiro-parasito entre crustáceos e peixes tem sido reportado, com o maior número de registros no Brasil (LUQUE *et al.* 2013). Em contraste, registros de copépodes parasitos de ciclídeos no Brasil são escassos, embora representem um dos grupos mais comuns de peixe de água doce.

Mais de 56 espécies de ergasilídeos de água doce encontrados no Brasil ocorre em peixes das famílias Anostomidae, Characidae, Pimelodidae and Prochilodontidae (TAVARES-DIAS *et al.* 2015). Em adição *E. coatiarus* Araújo e Varella, 1998, *E. pitalicus* Thatcher, 1984a e *E. sp. nov.* descrito neste estudo, outros dois copépodes parasitos são conhecidos de ciclídeos no Brasil, *Acusicola tucunarense* Thatcher, 1984b de *Cichla ocellaris* (Bloch e Schneider, 1801) na bacia amazônica e *Urogasilus brasiliensis* (Rosim, Boxshall e Ceccarelli, 2013) de *Cichla piquiti* (Kullander e Ferreira 2006) na bacia do Rio Araguaia (THATCHER, 1984b; LUQUE e TAVARES, 2007; LUQUE, *et al.* 2013; ROSIM, *et al.* 2013). Entretanto, somente uma pequena proporção de ciclídeos tem sido examinadas para análise parasitológica, sendo provável que a fauna de ergasilídeos nesses peixes hospedeiros é muito maior.

Ciclídeos neotropicais tiveram origem na África (MURRAY, 2001; POLETTO, *et al.* 2010), onde se diversificaram consideravelmente, com diferentes comportamentos adaptados a diferentes ambientes (KEENLEYSIDE, 1991). Oldewage (1988) listou 13 espécies de ergasilídeos africanos; eles podem ser facilmente distinguidos de *E. sp. nov.* pelos diferentes padrões de ornamentação cefálica.

Vinte e seis espécies de *Geophagus* são conhecidas na América do Sul e uma na América Central (FROESE, PAULY 2015), mas a maioria delas não tem sido estudadas para análise de parasitos. A descoberta da nova espécie de *Ergasilus* não somente representa a primeira espécie de copépodes parasitos reportados em *G. argyrostictus* e *G. altifrons*, mas também o primeiro registro de ergasilídeos em qualquer espécie de *Geophagus* na região Neotropical.

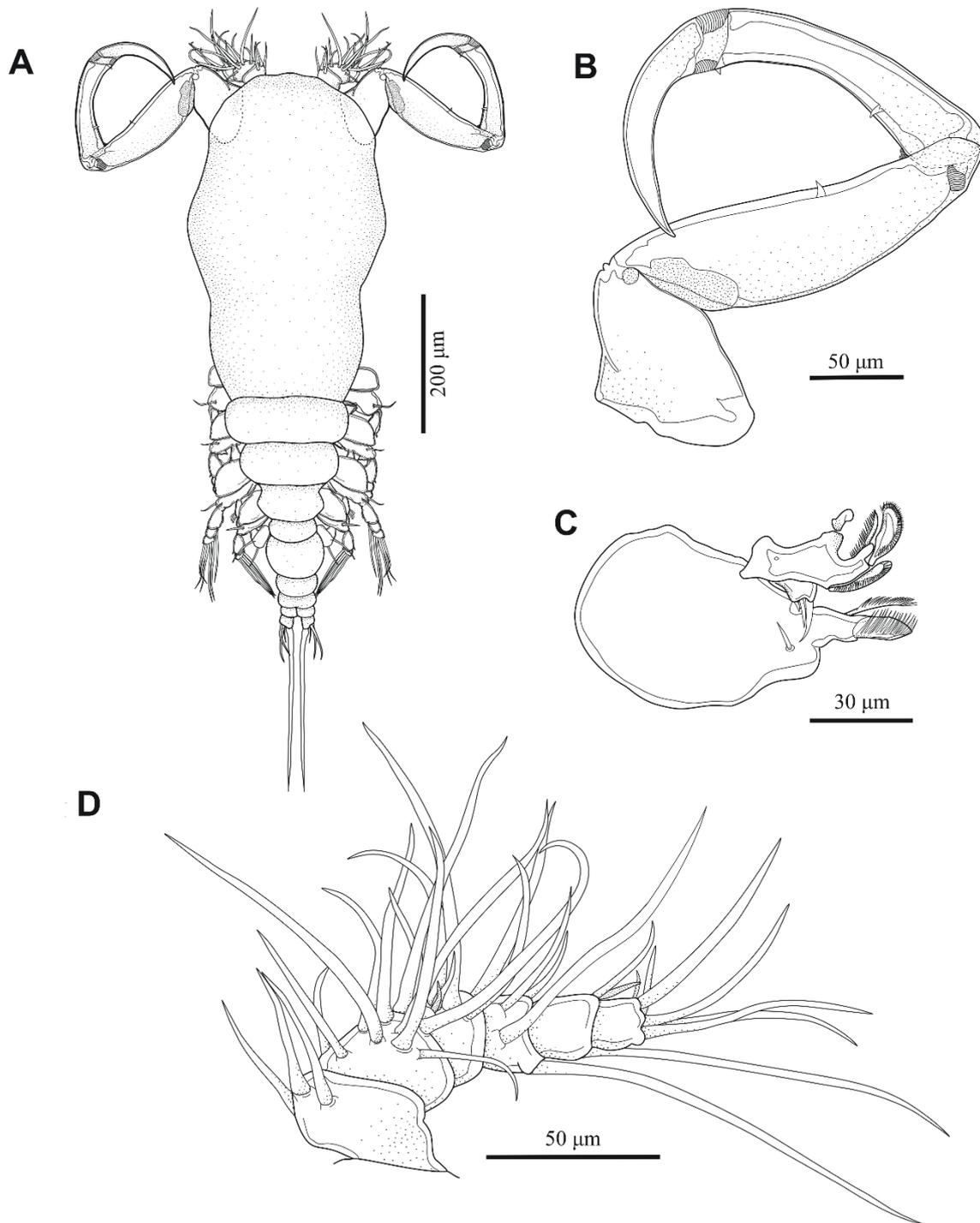


Fig. 1. *Ergasilus*. sp. nov. fêmea adulta de *Geophagus argyrostictus*. **A** – Vista dorsal do espécime inteiro; **B** – antena, ventral; **C** – Peças bucais, ventral; **D** – antênula, ventral.

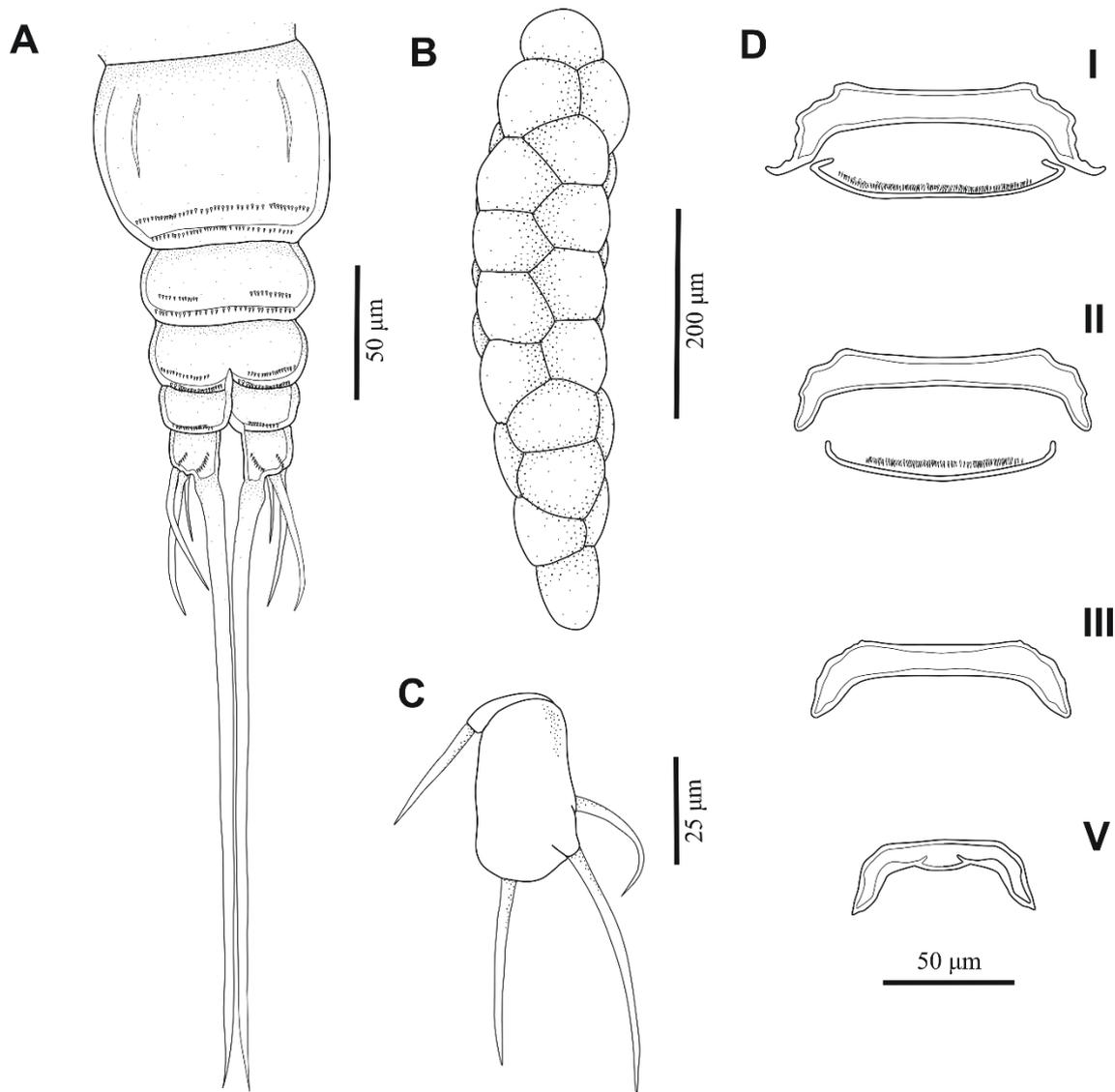


Fig. 2. *Ergasilus* sp. nov. fêmea adulta de *G. argyrostictus*. **A** – abdômen e ramo caudal, ventral; **B** – Saco ovífero, dorsal; **C** – Pata 5, ventral; **D** – placas interpodais das patas 1 a 4 (numeradas de I a IV), ventral.

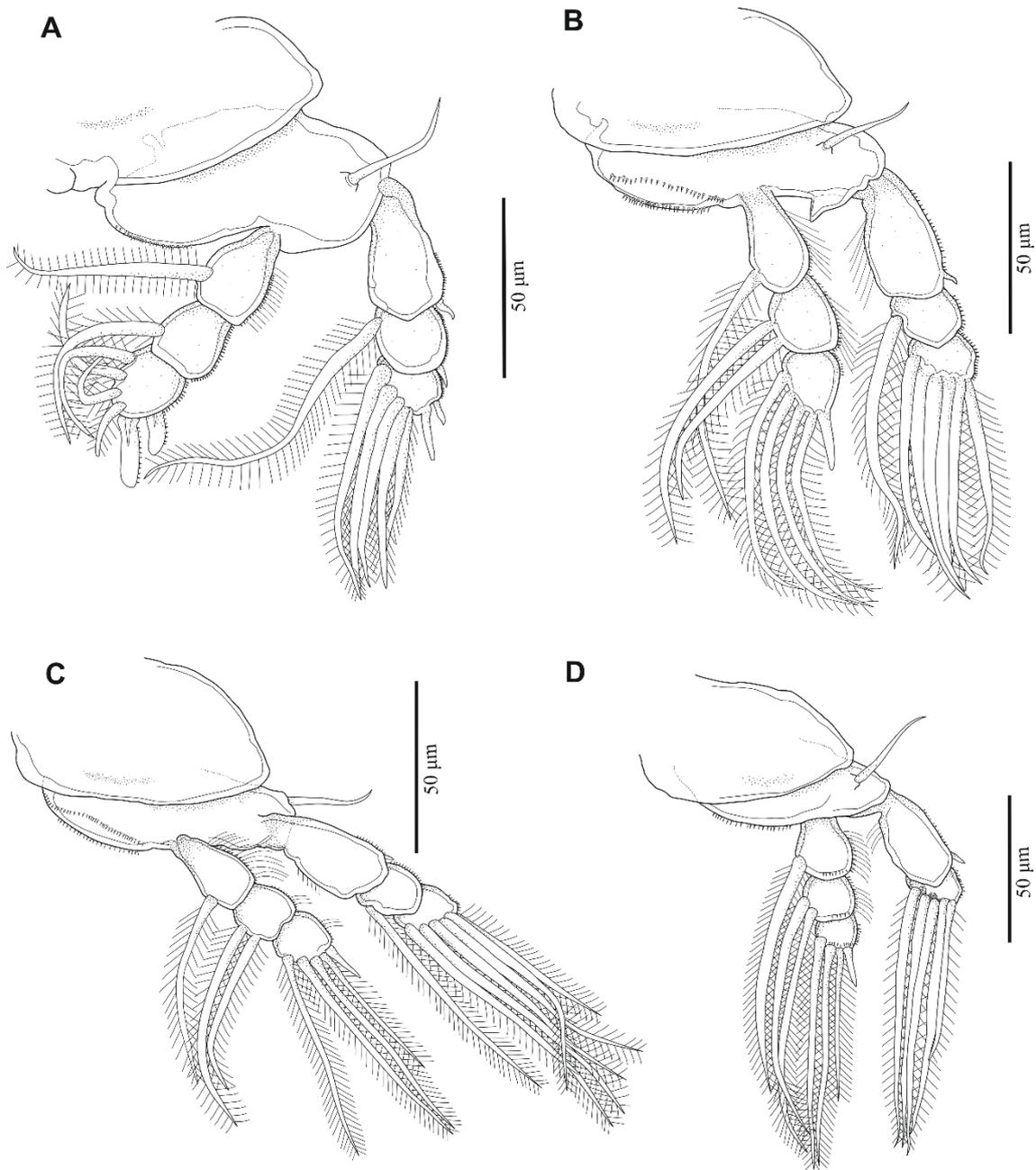


Fig. 3. *Ergasilus* sp. nov. fêmea adulta de *G. argyrostictus*. **A** – pata 1, ventral; **B** – pata 2, ventral; **C** – pata 3, ventral; **D** – pata 4, ventral.

CAPÍTULO II

ANÁLISE MORFOLOGICA E MOLECULAR DE DUAS ESPÉCIES DE *Encotyllabe* DIESING, 1850 (MONOGENEA: CAPSALIDAE) PARASITANDO PEIXES MARINHOS DO BRASIL.

RESUMO

Foi realizado um estudo morfológico e molecular de espécies de *Encotyllabe* parasitando peixes Perciformes buscando esclarecer algumas inconsistências taxonômicas presentes no grupo. São apresentadas sequências parciais para COI DNA mitocondrial juntamente com a descrição de duas espécies novas de *Encotyllabe*, anteriormente registradas como *E. spari*, *Encotyllabe* sp. nov. 1 parasitando *Pagrus pagrus* (Sparidae), *Encotyllabe* sp. nov. 2 parasitando *Orthopristis ruber* (Haemulidae), além da adição de novos dados para a espécie *E. souzalimae* Carvalho e Luque, 2012.

ABSTRACT

A morphological and molecular study was performed to review of *Encotyllabe* parasitizing fish Perciformes hosts seeking to clarify some taxonomic inconsistencies presents in the group. Partial sequences COI DNA mitochondrial are presented together with the description of two new species of *Encotyllabe*, recorded previously as *E. spari*, *Encotyllabe* sp. nov. 1 parasitizing *Pagrus pagrus* (Sparidae), *Encotyllabe* sp. nov. 2 parasitizing *Orthopristis ruber* (Haemulidae), with the addition of new data for the species *E. souzalimae* Carvalho e Luque, 2012.

3.3. INTRODUÇÃO

Segundo Kearn (1994) a adaptação de monogenéticos a locais como brânquias e outros locais internos, gerada provavelmente por uma alteração na pele do hospedeiro, é relativamente uma invasão recente, o parasito possivelmente buscou refúgio em regiões como a câmara branquial, onde encontrou um habitat menos suscetível a predação, sendo também encontrados, em menor escala, na cavidade bucal, no estômago, no intestino, no ceco, sistema reprodutor e urinário. Tal fato gerou adaptações principalmente no haptor destes parasitos, aqueles que parasitam brânquias foram os que sofreram maiores adaptações, variando de tamanhos de haptor, exceto Gyrodactylidae Van Beneden e Hesse, 1863 que mantiveram o haptor conservado. No gênero *Encotyllabe* Diesing 1850 o haptor em forma de sino e um par de grandes ganchos é uma adaptação que permite adequada fixação as papilas das placas faringeanas.

Encotyllabe é um gênero representante da família Capsalidae Baird, 1853, atualmente possui 24 espécies conhecidas (GIBSON, 2015), descritas em hospedeiros de diferentes habitats, distribuições geográficas e diferentes famílias entre as ordens Perciformes e Scorpaeniformes. Fato este que foge à regra da especificidade da maioria dos monogenéticos de acordo com a literatura (SASAL *et al.* 1998, WHITTINGTON *et al.* 2000).

Esse gênero possui barreiras taxonômicas, Khalil e Abdul-Salam (1988) afirma que há no grupo descrições a partir de um ou poucos espécimes e inconsistências de dados gerando a necessidade de novos estudos, assim pequenas variações intraespecíficas que devem ser consideradas e podem ser vistas perante análise de um número de espécimes são tidas como diferencial de espécies, dessa forma a presença de um ou poucos espécimes para a descrição torna-a inconsistente. Além de pequenas diferenças morfológicas como por exemplo a posição de testículos e reservatório vitelínico que podem ser alteradas de acordo com a pressão gerada na montagem de lâmina, achatamento e contrações resultantes da fixação (NOBLE, 1966), da mesma forma como visto por Yamaguti (1934) que deixa claro que há alterações principalmente nas medidas após a montagem do indivíduo ao afirmar que os parátipos de *E. spari* Yamaguti, 1934 são todos menores por não terem sido submetidos à pressão, a partir dessa afirmação tornam-se duvidosas as descrições baseadas apenas em medições.

Outro caracter com problemas na identificação são os ganchos marginais que não foram descritos em todas as espécies, Price (1939) afirma que de sete espécies até então descritas somente duas haviam sido registradas com ganchos, fato que poderia assumir como caráter presente em todos.

Na literatura atual há inconsistências a respeito do local de infecção, de acordo com Khalil e Abdul-Salam (1988) as placas faringeanas são mais condizentes ao haptor, além de que somente pequeno número de espécimes por ele foram encontradas nas brânquias, migração que pode ser ocasionada anterior ou posterior a morte do hospedeiro. Kearn e Whittington (1992) encontraram espécimes de *E. caballeroi* Velasquez, 1977 fixos às placas faringeanas, com os haptors ligados profundamente nas fendas de tecido entre os dentes faringeanos de forma que mesmo quando os parasitos apresentavam-se estendidos não era possível ver os haptors, fato que reforça que o local de infecção são as placas faringeanas, porém há diversos trabalhos que indicam algumas espécies nas brânquias e opérculos, assim como Chero *et al.* (2014), Cordeiro e Luque (2005) entre outros, porém este local não é adequado a estrutura de fixação de espécimes do gênero.

Noble (1966) sugeriu que as espécies descritas perante análise de somente um espécime, como por exemplo *E. lintoni* Monticelli, 1909, *E. masu* Ishii, Sawada, 1938, *E. pricei* Koratha, 1955 e *E. chironemi* Robinson, 1961, sejam consideradas como provisórias, tendo como

fundamento as inconsistências citadas acima, e talvez algumas sejam redescritas mais tarde. Afirmou ainda que o tamanho do parasita e o local de infecção sejam considerados de valor diagnóstico, junto de análise de maior número de espécimes, sugeriu ainda algumas características ou critérios que poderiam ser analisados para descrição e confirmação de novas espécies de *Encotyllabe*, assim como comprimento do pedúnculo estendido, distância entre o centro do ovário e o centro de um dos testículos, tamanho do ducto vitelínico antes de adentrar ao reservatório vitelínico, tamanho relativos do ovário e reservatório vitelínico, razão do comprimento dos grandes ganchos por comprimento dos pequenos, entre outros. Porém Khalil e Abdul-Salam (1988) afirmam que ao analisar um grande número de espécimes de *E. spari* percebeu-se que algumas dessas características são variantes intraespecíficas de acordo com a idade e maturidade, sugerindo então que fossem caracteres mais confiáveis à diferenciação a extensão da vitelária, a medida de vários órgãos, a posição dos testículos, o tamanho e formato dos ganchos; características estas utilizadas no presente estudo para diferenciação. Outro fator utilizado foi descrito por Sepúlveda *et al.* (2014) no qual afirmaram que com base em análise multivariada, a diferenciação entre espécies utilizando também a proporção do tamanho de diferentes órgãos ao invés de simples medidas, relacionada ao tamanho do corpo, possui boa capacidade discriminatória, confirmando ainda com base em estudo molecular o valor de até 1,4% de variabilidade intraespecífica.

Sabendo das inconsistências de dados citadas acima, percebemos a difícil tarefa de diferenciação visto que alguns dos padrões que acreditamos serem adequados sequer foram comentados em algumas descrições, tornando importante até mesmo um padrão de comparação para futuras análises. A especificidade é outro ponto a ser analisado seja para família ou ordem de hospedeiro, *E. spari* por exemplo, parasita segundo a literatura hospedeiros de diversas famílias, ordens e hábitos, fato a ser analisado. Possuímos um claro exemplo no presente estudo que analisa espécies do gênero parasitando *Orthopristis ruber* Cuvier, 1830 e *Pagrus pagrus* Linnaeus, 1758 que segundo a literatura apresentam *E. spari*.

Tendo em vista as inconsistências taxonômicas presentes no gênero *Encotyllabe*, o presente estudo teve como objetivo avaliar prévios registros para o grupo, descrevendo duas espécies novas de *Encotyllabe*, parasitando *Orthopristis ruber* e *Pagrus pagrus*, anteriormente classificadas como *E. spari*, adicionando também dados moleculares de sequências parciais do gene COI, das referidas espécies. E adicionalmente redescrever a espécie *E. souzalimae*.

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

Os hospedeiros foram adquiridos no Ceasa (Central Estadual de Abastecimento S/A), na cidade do Rio de Janeiro, RJ, sendo capturados por pescadores profissionais na costa de Cabo Frio (23°S, 42°W). Imediatamente foram acondicionados em caixas térmicas contendo gelo, para garantir uma boa conservação tanto do peixe, quanto do parasito durante o transporte até o Laboratório de Parasitologia de Peixes na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Previamente identificados de acordo com Menezes e Figueiredo (1980), foram necropsiados imediatamente ou acondicionados em congeladores para preservá-los.

Os peixes foram necropsiados inicialmente pela retirada das brânquias e lavagem da cavidade seguido de uma incisão ventral, desde a abertura anal até a linha do opérculo, expondo a cavidade corporal; o estômago juntamente com esôfago e placas faríngeas foram retirados e lavados. Tanto a parede dos órgãos quanto o sedimento obtido da lavagem foram analisados em placas de petri com solução salina fisiológica 0,65% NaCl, examinados com o auxílio de microscópio estereoscópico. O estômago e as brânquias foram analisados por segurança, visto que os parasitos aqui analisados podem se soltar durante a morte do hospedeiro e serem encontrados soltos nestes locais. Os espécimes encontrados estavam em sua maioria fixos nas placas faríngeas.

Além do material coletado no presente estudo, para fins de comparação, também foram analisados alguns espécimes de *Encotyllabe* spp. fornecidos pelo Dr. José Luis Luque, que foram obtidos em estudos anteriores (LUQUE *et al.*, 1996; PARAGUASSÚ *et al.*, 2002; CARVALHO e LUQUE, 2012), e adicionalmente os seguintes espécimes depositados na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC):

34531 – *E. spari* de *Pagrus pagrus* de Paraguassú *et al.* (2002).

32019, 32064, 32068 – *E. spari* de *Haemulon sciurus* (Shaw, 1803) de Kohn *et al.* (1984).

37947 – *E. spari* de *Anisotremus virginicus* (Linnaeus, 1758) de Paschoal *et al.* (2012).
Dados não publicados.

37948 – *E. spari* de *Conodon nobilis* (Linnaeus, 1758) de Paschoal *et al.* (2010) – Dados não publicados.

37382 (holótipo), 37383, 37384, 37385 – *E. souzalimae* de *Trichiurus lepturus* Linnaeus, 1758 de Carvalho & Luque (2012).

3.4.1. Fixação

Após coletados foram subdivididos em dois grupos, um para análise molecular e outro para análise morfológica, e estes foram fixados em álcool 80% e formalina 4%, respectivamente.

Alguns espécimes foram cortados antes da fixação para se ter a confiabilidade de que o parasito analisado em ambas análises é da mesma espécie visto a possibilidade de espécies crípticas e da existência de mais de uma no mesmo hospedeiro. Como especificado por Boeger *et al.* (2014) os espécimes separados para análise molecular foram cortados, com o auxílio de bisturi esterilizado, na região próxima ao pedúnculo e também abaixo dos testículos, permitindo que o mesmo parasito fosse identificado em ambas análises, desta forma a região anterior e posterior foram utilizadas para identificação taxonômica e a região mediana foi utilizada para análise molecular.

3.4.2. Análise Morfológica

Para análise dos órgãos internos, os monogenéticos foram corados em Carmim utilizando o protocolo adaptado de Amato *et al.* (1991) e montados em bálsamo do Canadá. Para análise de estruturas esclerotizadas os parasitos foram montados entre lâmina e lamínula em uma mistura de glicerina e ácido pícrico (GAP).

Foram feitas medições no microscópio Olympus BX51 através do software Cell^R&Cell^RImaging Life Science Microscopy. Todas as medidas são expressas em micrômetros, salvo indicação em contrário. Os desenhos foram feitos através de um tubo de desenho acoplado a um microscópio Olympus BX53 equipado com contraste de fases.

3.4.3. Análise Molecular

Foi analisado o gene citocromo c oxidase I (COI). As sequências foram editadas por meio do programa Geneious 8.7.®

3.4.4. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada por meio de Kit Sigma-Aldrich REDEExtract-N-Amp Tissue PCR XNAT-10rxn, seguindo as especificações do fabricante, mantendo-o ressuspenso em 30µL de tampão AE e armazenado a 4°C até a amplificação.

3.4.4.1. Reações em cadeia da polimerase (PCR) para COX mDNA

Para reação em cadeia da polimerase (PCR) foram utilizados os oligonucleotídeos JB3 (Forward; 5'- TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT - 3') desenhado por Bowles *et al.* (1993) e JB4 (Reverse; 5'- TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG - 3'). O volume final da reação foi de 20 µL, sendo 4 de água, 10 de Red extraction, 1 de cada primer, 4 de DNA extraído. As amostras foram colocadas no termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf) e submetidas às seguintes condições: pré-aquecimento 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 50°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 2 minutos (extensão) e um ciclo final de 72°C por 7 minutos. Os produtos deste foram submetidos junto do corante GelRed à técnica de eletroforese em gel de agarose para visualização dos fragmentos de DNA.

3.4.4.2. Determinação das sequências nucleotídicas

Os produtos da PCR foram submetidos ao sequenciamento de ambas as fitas no Instituto de Biologia na Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) com o uso do sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems-Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA).

3.4.4.3. Análise computacional das sequências nucleotídicas

As sequências foram obtidas em forma de cromatogramas e analisadas no programa Geneious 8.7, na qual as sequências nucleotídicas consenso foram alinhadas pelo algoritmo CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994) e editadas.

As sequências depositadas no GenBank referentes a *Encotyllabe antofagastensis* (SEPÚLVEDA, *et al.* 2014) (JQ782836, JQ782837, JQ782838, JQ782839, JQ782840) e *E. cheilodactyli* (SEPÚLVEDA, *et al.* 2014) (JQ782841, JQ782842, JQ782843, JQ782844,

JQ782845), juntamente com a sequência de *Neobenedenia* sp. (JQ782846) utilizada como grupo externo e as sequências obtidas no presente trabalho foram utilizadas na construção da árvore filogenética, para tal utilizamos do mesmo programa empregando inferência Bayesiana a partir do modelo de evolução GTR usando os plug-ins PHYML e MrBayes do programa Geneious, respectivamente. A veracidade dos ramos conferida por análise de “bootstrap” (1000 repetições).

Ambos os dados, molecular e morfológico, foram correlacionados para comparar as espécies de parasitos identificadas com os apresentados na literatura. As sequências nucleotídicas serão depositadas no GenBank.

3.5. RESULTADOS

Família Capsalidae Baird, 1853

Subfamília Encotyllabinae Monticelli, 1892

Encotyllabe sp. nov. 1 (Figs 1. A-D).

Descrição (baseada em 20 espécimes): Corpo elipsoide 1,94mm (1,77mm–2,5mm) de comprimento; 891,83 (704,93–1119,78) de largura ao centro do corpo. Região anterolateral ornamentada com duas ventosas 155,4 (129,35–176,83) de diâmetro, envoltas por uma membrana lobular. Haptor pedunculado em formato de sino 493,82 (448,47–587,64) de diâmetro, com uma fina membrana marginal 35,55 (27,39–39,16), pedúnculo 620,23 (556,55–654,41) de comprimento. Haptor armado com um par de âncoras maiores; 249,94 (212,68–270,31) de comprimento; um par de pequenas âncoras 30,47 (29,54–32,11) de comprimento e 14 ganchos marginais 12,71 (11,07–14,68). Boca com processo digitiforme conduzindo a uma faringe irregular 234,99 (176,48–237,78) de diâmetro. Ceco intestinal ramificado estendendo-se posteriormente até próximo ao pedúnculo, não confluyente. Dois pares de ocelos no nível da faringe. Testículos ovais, lado a lado, anteriores ao meio do corpo 299,96 (246,43–356,16) de comprimento; 209,32 (140,10–242,77) de largura. Vaso deferente sinuoso localizando-se anteriormente do lado esquerdo do corpo, entrando na base do pênis e expandindo-se lateralmente formando a vesícula seminal e ducto ejaculatório. Duto prostático unindo-se ao ejaculatório próximo a extremidade do pênis. Pênis muscular 296,92 (237,08–344,36) de comprimento; 102,19 (93,3–107,93) de largura com uma prolongação voltada para região anterior. Ovário pré-testicular, oval, imediatamente posterior ao reservatório vitelínico 123,39 (91,33–164,85) de comprimento, 169,31 (130,1–194,96) de largura, com receptáculo seminal intraovariano. Útero se estende ao lado posterior do pênis. Poro vaginal na região ventral do reservatório vitelínico que se encontra do lado esquerdo do corpo. Folículos vitelínicos estendendo lateralmente e no meio do corpo, da faringe até próximo ao pedúnculo. Ovos não observados.

Resenha taxonômica

Hospedeiro tipo: *Pagrus pagrus* Linnaeus, 1758 (Perciformes: Sparidae)

Sítio de infecção: Placas Faríngeas

Localidade-tipo: Cabo Frio, Litoral do Rio de Janeiro

Prevalência: 62%

Intensidade média: 1,53

Material depositado: CHIOC N° 34531

Comentários

Seis espécies de *Encotyllabe* foram registradas em hospedeiros da família Sparidae, sendo estes *E. lintoni* parasitando *Calamus calamus* Valenciennes, 1830 nas ilhas Bermudas e *Pagrus pagrus* Linnaeus, 1758 no Rio de Janeiro; *E. monticelli* Perez Viguera, 1940 registrado em *Calamus bajonado* (Bloch e Schneider, 1801) em Cuba; *E. pagelli* Van Beneden e Hesse, 1863 de *Pagellus bogaraveo* (Delaroche, 1809) na Irlanda e Grã-Bretanha; *E. pagrosomi* MacCallum, 1917 de *Chrysophrys auratus* (Foster, 1801) na Austrália; *E. vallei* Monticelli, 1907 de *Diplodus puntazzo* (Walbaum, 1792) no mar Adriático; *E. spari* Yamaguti, 1934

registrado em *Acanthopagrus schlegelii schlegelii* (Bleeker, 1854) no Japão e em *Pagrus pagrus* no Rio de Janeiro.

O pênis de *Encotyllabe* sp. nov. 1 nova espécie apresenta uma prolongação próxima ao poro genital e a vesícula seminal mais próxima a base com uma curvatura, características diferente de todas as espécies do gênero descritas até o presente momento. Porém podemos diferenciar a presente espécie daquelas com registro em hospedeiros da família Sparidae considerando também outros caracteres, isto é, a presente espécie difere de *E. lintoni* pelo formato dos grandes ganchos; de *E. pagelli* pelo testículo alcançar, mas não ultrapassar o meio do corpo, além de possuir ventosas anteriores próximas; difere de *E. pagrosomi* pelo formato do corpo; difere de *E. spari* pela proporção ovário/testículo muito maior; e difere de *E. vallei* pela proporção gancho maior/menor ser maior.

Os espécimes analisados para comparação possuem similaridade comum ao aqui estudado, confirmando nossos resultados e os diferenciando da presente literatura.

De acordo com os dados moleculares, a espécie apresentada diferiu-se de todas outras analisadas neste estudo e das já conhecidas na literatura neste âmbito, corroborando com os dados morfológicos, porém como não há sequências de *E. spari* depositadas, não há como fazer uma identificação de similaridade de espécie. As espécies parasitas de *Orthopristis ruber* e *Pagrus pagrus* apresentaram similaridade baixa como podemos perceber na Tabela 1, vistas bem separadas na árvore filogenética, confirmando que são distintas as espécies parasitas de ambos hospedeiros.

Encotyllabe sp. nov. 2 (Fig. 2).

Descrição (baseada em 13 espécimes): Corpo em formato de sino, afilado anteriormente e largo posteriormente 3,19mm (2,74mm–3,6mm) de comprimento; 1,23mm (814,38µm–1,65mm) de largura ao centro do corpo. Região anterolateral ornamentada com duas ventosas 253,12 (179,44–304,46) de diâmetro, envoltas por uma membrana lobular. Haptor pedunculado em formato de sino 664,75 (476,17–784,05) de diâmetro, membrana marginal 61,82 (45,5–75,76), pedúnculo 541,38 (650,59) de comprimento. Haptor armado com um par de âncoras maiores com 280,98 (248,29–338,82) de comprimento; um par de âncoras menores 28,46 (24,78–30,10) de comprimento e 14 ganchos marginais 11,58 (10,19–13,04). Boca com processo digitiforme conduzindo a uma faringe irregular 388,72 (268,59–446,01) de diâmetro. Ceco intestinal ramificado estendendo-se posteriormente até próximo ao pedúnculo, não confluyente. Dois pares de ocelos no nível da faringe. Testículos ovais, lado a lado, anteriores ao meio do corpo 155,62 (135,11–181,57) de comprimento; 120,89 (102,89–175,51) de largura. Vaso deferente sinuoso anteriormente, localizado ao lado esquerdo do corpo, entrando na base do pênis e expandindo-se lateralmente formando a vesícula seminal e ducto ejaculatório. Pênis muscular 209,3 (185,16–227,95) de comprimento; 107,58 (89,07–122,61) de largura. Ovário pré-testicular, oval, imediatamente posterior ao reservatório vitelínico 183,37 (174,4–209,38) de comprimento; 223,55 (186,52–247,65) de largura, com receptáculo seminal intraovariano. Útero estendendo-se ao lado posterior do pênis. Poro vaginal na região ventral do reservatório vitelínico que se encontra ao lado esquerdo do corpo. Folículos vitelínicos estendendo lateralmente e no meio do corpo, da faringe até próximo ao pedúnculo. Ovo piramidal com quatro filamentos, cada um em uma extremidade, sendo um maior do que os outros.

Resenha taxonômica

Hospedeiro tipo: *Orthopristis ruber* Cuvier, 1830 (Perciformes: Haemulidae)

Sítio de infecção: Placas Faríngeas.

Localidade-tipo: Cabo Frio, Litoral do Rio de Janeiro

Prevalência: 100%

Intensidade média: 3,87

Comentários

Atualmente, *E. spari* e *E. pagrosomi* são representante do gênero registradas parasitando *Orthopristis ruber* (COHEN *et al.* 2013), porém no presente estudo outra espécie é registrada parasitando este hospedeiro, e como apresenta características que o diferem de seus congêneres, como testículo com proporções menores que o ovário, pênis pequeno com o poro genital abaixo da faringe, esta espécie é descrita como nova no presente estudo.

Em comparação com as espécies descritas na literatura esta espécie apresenta o corpo mais comprido e a região anterior afilada alargando posteriormente, não elipsoide como em *E. spari*, porém similar a *E. pagrosomi*. Outros fatores os diferenciam como o formato do pênis e a sua extensão, de forma que o da presente espécie está por completo abaixo da faringe, enquanto que outras ambas espécies possuem o mesmo comprido, estendendo-se lateralmente, apresentando o poro genital ao lado esquerdo da faringe, além do pênis da nova espécie ser menor que o de *E. spari* e *E. pagrosomi*. A proporção entre ovário e testículos são bem distintas, visto que nos espécimes aqui estudados os testículos apresentam proporções menores que o ovário, enquanto que nas outras espécies ocorre o oposto. Nenhuma espécie do grupo apresenta testículos pequenos em relação ao tamanho do ovário como a espécie aqui apresentada. Apesar

do tamanho destes órgãos serem considerados de caráter duvidoso para diferenciação devido a possível imaturidade dos indivíduos, todos espécimes encontrados no hospedeiro, seja em lâminas fornecidas para análise do estudo ou as do presente apresentaram esta característica, foi identificada também a presença de ovos no útero, próximo ao poro genital.

As seguintes espécies também foram descritas em hospedeiros da família Haemulidae: *E. antofagastensis*, *E. kuwaitensis*, *E. pagrosomi* e *E. spari*, (Khalil e Abdul-Salam, 1988). A nova espécie difere de *E. antofagastensis* pelo formato do pênis e pela proporção ovário/testículo; difere de *E. kuwaitensis* pelo formato do corpo e por possuir testículos justapostos; difere de *E. pagrosomi* pelo tamanho do pênis, pelo mesmo não alcançar a região lateral da faringe e por possuir testículos menores que os ovários.

O formato do corpo afilado anteriormente se assemelha dentre as espécies descritas apenas ao de *E. chironemi* e *E. pagrosomi*, porém o formato do pênis descrito por Williams, Berveley-Burton (1989) apresenta uma terminação ampla e musculosa diferentemente da aqui apresentada.

Espécimes depositados como *E. spari* na Coleção Helminológica na Fiocruz de diferentes hospedeiros da família Haemulidae (*Conodon nobilis*, *Anisotremus virginicus*, *Haemulon sciurus*) foram analisados. Todos possuem o padrão morfológico similar ao apresentado em *E. sp. nov. 2* (testículos menores que o ovário e acima do meio do corpo, pênis com poro genital abaixo da faringe, além do tamanho e formato do mesmo), a partir deste dado podemos pressupor certa especificidade da espécie à família do hospedeiro, porém devem ser feitos estudos mais aprofundados principalmente utilizando ferramentas molecular para confirmação.

Foram identificados dois ovos piramidais ainda no útero, cada um em um espécime do parasito, os quais são similares aos descritos por Kohn *et al.* (1984). Há poucos registros de ovos para o gênero, alguns considerados como duvidosos para a espécie por terem sido encontrados próximos, mas não dentro do parasito.

Os dados moleculares corroboram com os dados morfológicos, caracterizando a espécie aqui estudada diferente de *E. antofagastensis* e *E. cheilodactyli*, além de separar as espécies parasitas de *Orthopristis ruber* e *Pagrus pagrus* na árvore filogenética e com baixa similaridade (40%) como podemos ver na Tabela 1, confirmando que há diferentes espécies parasitando ambos hospedeiros. Esta é a segunda sequência diferente do gene COI referente a *Encotyllabe* parasitando um hospedeiro da família Haemulidae.

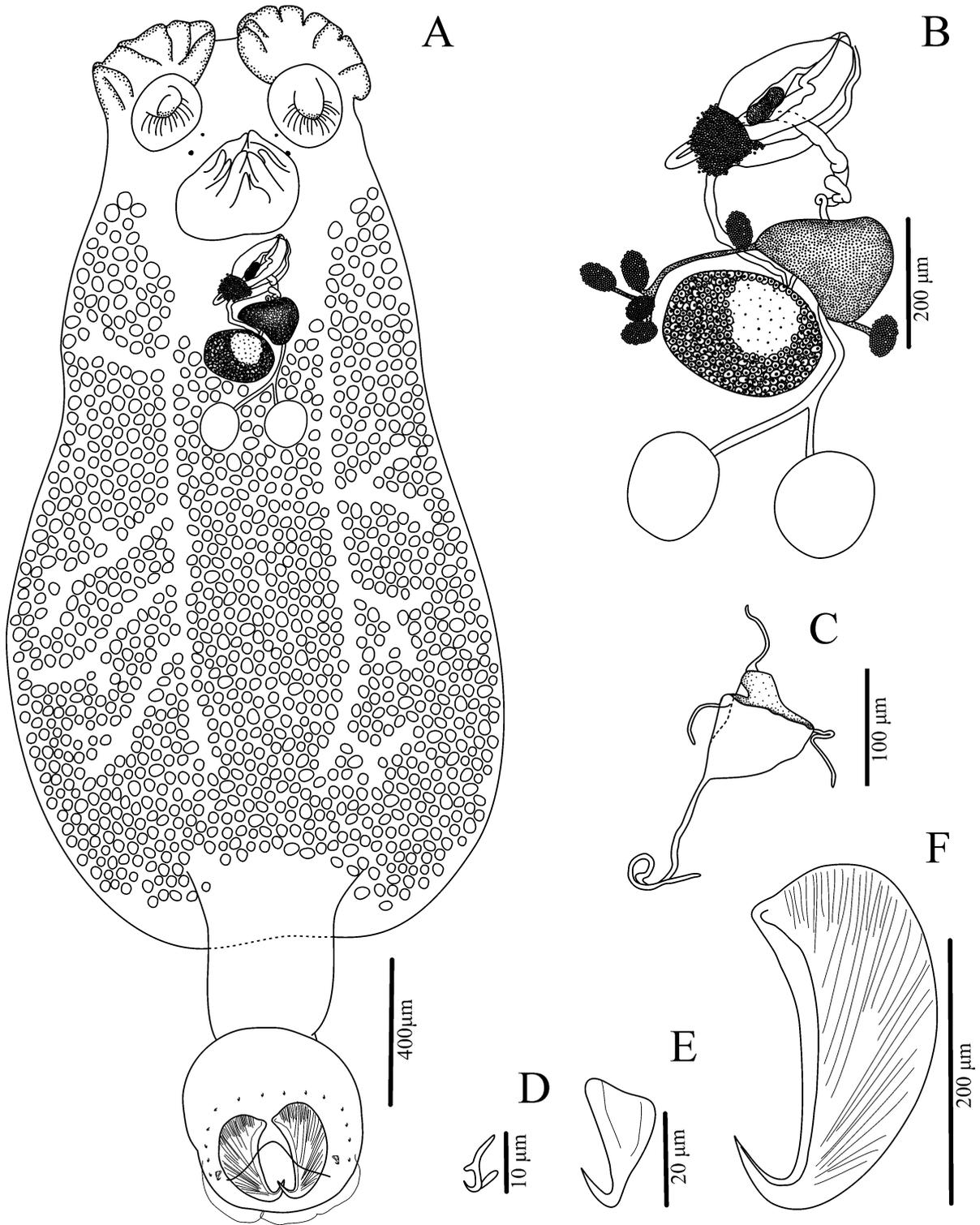


Fig 2. *Encotyllabe* sp 2 de *Orthopristis ruber*. **A** – vista ventral; **B** – sistema reprodutor; **C** – ovo; **D** – ganchos; **E** – âncora menor; **F** – âncora maior.

***Encotyllabe souzalimae* Carvalho e Luque, 2012 (Fig. 3)**

Descrição (baseada em 1 espécime): Corpo alongado, 1082,99 de largura ao centro do corpo. Região anterolateral ornamentada com duas membranas 219 de diâmetro, envoltas por uma membrana lobular. Haptor pedunculado em formato de sino, com uma fina membrana marginal. Haptor armado com um par de âncoras maiores, 309,41 de comprimento; um par de pequenas âncoras 29,43 de comprimento. Boca com processo digitiforme conduzindo a uma faringe globular 345,04 de diâmetro. Ceco intestinal ramificado estendendo posteriormente até próximo ao pedúnculo, não confluyente. Dois pares de ocelos no nível da faringe. Testículos ovais, lado a lado, anterior ao meio do corpo 438,03 (419,69–456,36) de comprimento; 250,64 (250,62–250,64) de largura. Vaso deferente sinuoso anteriormente do lado esquerdo do corpo, entrando na base do pênis e expandindo em largura formando a vesícula seminal e duto ejaculatório. Duto prostático se junta ao ejaculatório próximo a extremidade do pênis. Pênis muscular. Ovário pré-testicular, oval, imediatamente posterior ao reservatório vitelínico, com receptáculo seminal intraovariano. Útero se estende ao lado posterior do pênis. Poro vaginal na região ventral do reservatório vitelínico que se encontra do lado esquerdo do corpo. Folículos vitelínicos estendendo lateralmente e no meio do corpo da faringe até próximo ao pedúnculo. Ovo piramidal observado no útero.

Resenha taxonômica

Hospedeiro tipo: *Trichiurus lepturus* Linnaeus, 1758.

Sítio de infecção: Placas Faríngeas

Localidade: Cabo Frio, Litoral do Rio de Janeiro

Prevalência: 7%

Material depositado: CHIOC N° 37382, 37383, 37384, 37385.

Comentários

Encotyllabe souzalimae foi descrito em *Trichiurus lepturus*, na qual o principal carácter de diferenciação seria a posição dos testículos e formato dos ganchos. A espécie tipo foi analisada e identificamos diferença morfológica nos pequenos ganchos entre a representada por Carvalho e Luque (2012) e os espécimes depositados, esta corrobora com o do presente estudo (Figura 3B).

Apresentamos adicionalmente o primeiro registro de ovo para a espécie, este encontrado ainda no útero (Figura 3A), além de sequências parciais de mt DNA para a espécie, diferenciando-a de todas as presentes no GenBank e aqui estudadas.

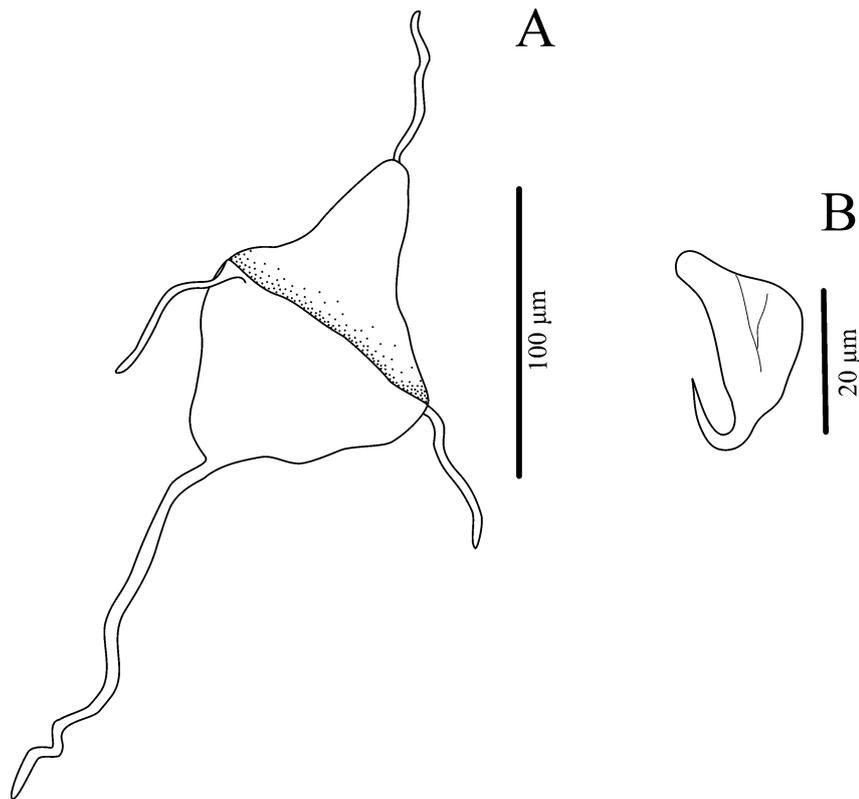


Fig 3. *Encotyllabe souzalimae*. **A** – ovo; **B** – âncora menor.

As sequências de mtDNA que obtivemos e as presentes no GenBank foram alinhadas e apresentaram baixa similaridade quanto a espécie, confirmando que são espécies diferentes como é demonstrado pela morfologia. Entre as espécies aqui descritas, as sequências de mtDNA obtiveram suficiente distinção que é representado pela árvore filogenética aqui apresentada (Figura 4), podemos perceber esta distinção também pela Tabela 1 a qual demonstra a similaridade genética entre as espécies analisadas, separando claramente aquelas espécies previamente registradas como *E. spari* em distintas espécies, o que corrobora com os dados morfológicos

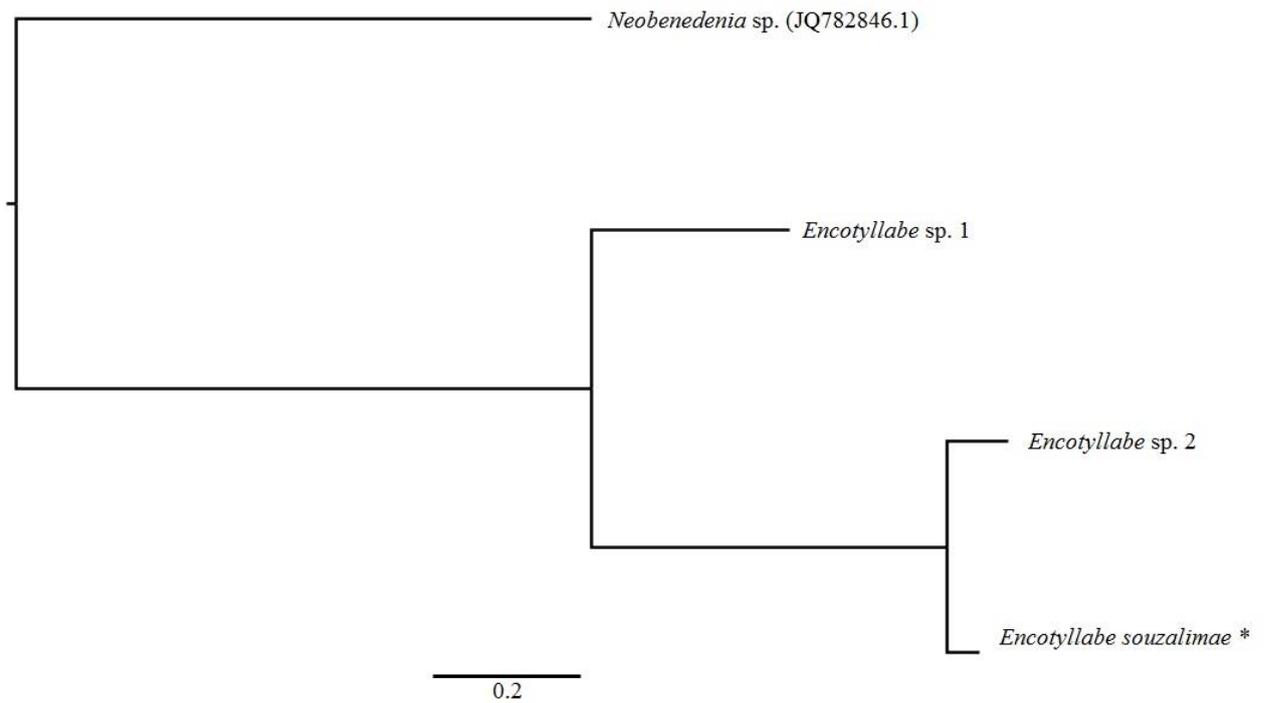


Fig 4. Árvore construída a partir do modelo PHYML com sequências de *Encotyllabe* spp. obtidas neste estudo a partir de dados mtDNA COI. *Neobenedenia* foi utilizado como grupo externo. (*) Sequência obtida no presente estudo

Tabela 1. Similaridade genética entre espécies de *Encotyllabe* depositadas no GenBank e as apresentadas no presente estudo. (*) Sequências obtidas no presente estudo.

		<i>Neobenedenia</i> sp.	<i>E. sp</i> nov. 1	<i>E. sp.</i> nov. 2	<i>Encotyllabe</i> <i>souzalimae</i> *	<i>Encotyllabe</i> <i>cheilodactyli</i>	<i>Encotyllabe</i> <i>antofagastensis</i>	<i>E. cheilodactyli</i> (Sepúlveda <i>et al.</i> 2014)				<i>E. antofagastensis</i> (Sepúlveda <i>et al.</i> 2014)			
		JQ782846	-	-	-	JQ782843	JQ782837	JQ782844	JQ782841	JQ782842	JQ782845	JQ782839	JQ782836	JQ782840	JQ782838
<i>Neobenedenia</i> sp.	JQ782846		37%	40%	38%	79%	81%	78%	79%	79%	78%	81%	81%	81%	81%
<i>Encotyllabe</i> sp. nov. 1	-	52%		47%	48%	37%	36%	37%	37%	37%	37%	36%	36%	36%	36%
<i>Encotyllabe</i> sp. nov. 2	-	40%	47%		41%	41%	40%	41%	41%	41%	41%	40%	40%	40%	40%
<i>E. souzalimae</i> *	-	52%	49%	48%		54%	53%	54%	54%	54%	54%	53%	54%	54%	54%
<i>E. cheilodactyli</i>	JQ782843	79%	37%	41%	40%		92%	99%	99%	99%	99%	91%	92%	91%	92%
<i>E. antofagastensis</i>	JQ782837	81%	36%	41%	41%	92%		91%	91%	91%	91%	99%	99%	99%	99%
<i>E. cheilodactyli</i>	JQ782844	78%	37%	41%	40%	99%	91%		99%	99%	99%	91%	91%	91%	91%
	JQ782841	79%	37%	41%	40%	99%	91%	99%		100%	99%	91%	91%	91%	91%
	JQ782842	79%	37%	41%	40%	99%	91%	99%	100%		99%	91%	91%	91%	91%
	JQ782845	78%	37%	41%	40%	99%	91%	99%	99%	99%		91%	91%	91%	91%
<i>E. antofagastensis</i>	JQ782839	81%	36%	40%	41%	91%	99%	91%	91%	91%	91%		99%	99%	99%
	JQ782836	81%	36%	40%	41%	92%	99%	91%	91%	91%	91%	99%		99%	99%
	JQ782840	81%	36%	40%	41%	91%	99%	91%	91%	91%	91%	99%	99%		99%
	JQ782838	81%	36%	40%	41%	92%	99%	91%	91%	91%	91%	99%	99%	99%	

3.6. DISCUSSÃO

O presente estudo fornece a descrição de duas novas espécies do gênero *Encotyllabe*, incluindo sequências parciais do gene COI (DNA mitocondrial) e acrescenta observações suplementares sobre a espécie *E. souzalimae*. Atualmente 24 espécies são aceitas, porém Sepúlveda *et al.* (2014) afirmou que somente quatro espécies são facilmente distinguidas por caracter morfológico, sendo estas *E. caranxi* Lebedev, 1967, *E. kuwaitensis*, *E. pagelli*, *E. souzalimae*; podemos incluir também as espécies por eles descritas *E. antofagastensis* e *E. cheilodactyli*, fato que reforça a necessidade de reavaliação no grupo.

O primeiro registro de *Encotyllabe* incluindo a descrição dos ovos na América do Sul foi feito por Kohn *et al.* (1984), registrando *E. spari* em *Haemulon sciurus* (Shaw, 1803) no Rio de Janeiro. Posteriormente houveram outros registros de *E. spari* nesta região: em *Orthopristis ruber* por Luque *et al.* (1996); em *Menticirrhus americanus* por Chaves e Luque (1999); Paraguassú *et al.* (2002) e Soares *et al.* (2014) identificaram na mesma espécie de hospedeiro, *Pagrus pagrus*; além de *Dactylopterus volitans* por Cordeiro, Luque (2005). Outros registros desta espécie também ocorreram no Japão (YAMAGUTI, 1934), no Golfo Árabe (KHALIL e ABDU-SALAM, 1988; KARDOUSHA *et al.* 2002) e no Golfo de Tonkin (MAMAIEV, 1970). Dentre as espécies deste gênero, *Encotyllabe spari* é a que possui registros nas mais diversas famílias e em duas ordens de hospedeiros.

Até o presente momento, outras cinco espécies também foram registradas na América do Sul, sendo elas: *E. antofagastensis*, *E. callaoensis* Tantalean, 1974 e *E. cheilodactyli*, encontradas parasitando peixes no oceano Pacífico e *E. lintoni* e *E. souzalimae* encontradas em peixes no oceano Atlântico.

Em *Pagrus pagrus* há registro de duas espécies de *Encotyllabe*, isto é, *E. lintoni* e *E. spari* (FÁBIO, 1998; PARAGUASSÚ *et al.* 2002). *Encotyllabe lintoni* foi descrito por Linton (1907), parasitando *Calamus calamus* nas ilhas Bermudas, Reino Unido. E já foi registrado também em *Pagrus pagrus* outro representante da família Sparidae, no Rio de Janeiro, Brasil por Fábio (1998). Esta espécie foi descrita com base em um único espécime, como diversas espécies do gênero, e este foi analisado por Monticelli (1909) e por Price (1939), e Price sugere que este seja *E. spari* visto que só havia um espécime para análise, o qual seria muito parecido com este, porém com leves diferenças nas medições, o que poderia ser uma variação, mas não seria suficiente para ser considerada nova espécie, diferente de Monticelli que observou no mesmo espécime ganchos com formato diferente de *E. spari*. Esta espécie foi redescrita por Fábio (1998) parasitando *Pagrus pagrus*, e o mesmo sugere que *Calamus calamus* seja apenas um hospedeiro acidental, visto que foi encontrado apenas um espécime nas brânquias do mesmo e a área de dispersão de ambos hospedeiros ser a mesma. Porém podemos identificar diferença no formato dos ganchos entre *E. lintoni* e *E. spari* não evidenciada por Fábio (1998), mas demonstrada pelos pesquisadores anteriormente citados. Vale ressaltar que a coleção no qual foi depositado este material, foi procurada e aparentemente não está mais em funcionamento, impedindo a confirmação desta espécie em *Pagrus pagrus*.

Os espécimes analisados que foram fornecidos por José Luis Luque são de completa similaridade morfológica com aqueles por nós coletados, reafirmando nossos dados. E a partir dos presentes dados podemos entender que *E. spari* é um parasito generalizado pelos pesquisadores, pois além de trabalhos com desenhos representando parasitos com diferenças morfológicas se referindo ao mesmo, durante o presente estudo não encontramos a espécie nos hospedeiros já registrados, embora haja a possibilidade de ambas parasitarem o mesmo hospedeiro, reafirma-se a necessidade de revisão para o grupo. Deve ser considerada também a

possibilidade da existência de espécies crípticas (espécies idênticas morfologicamente e distintas geneticamente) que somente podem ser reconhecidas perante estudos moleculares.

A partir da variação entre as medidas observadas no presente trabalho, percebemos que é inconsistente a identificação de uma espécie somente por medidas de poucos espécimes como ocorre no grupo, fato considerado inclusive por estudos moleculares, pois Hebert *et al* (2003) identificou que há variação genética intraespecífica sendo a distância genética de 3% entre espécies de invertebrados o suficiente para distingui-las. Entretanto Sepúlveda *et al.* (2014) encontrou até 1,4 % de variabilidade intraespecífica ao analisar duas espécies de *Encotyllabe*. Podemos afirmar que são caracteres adequados para a identificação de espécies do gênero a forma dos ganchos e corpo, forma e posição do pênis, a distância entre testículos e o meio do corpo, a proporção ovário/testículos e a distribuição da vitelária junto da proporção dos órgãos.

Em nossos resultados obtivemos espécies diferentes parasitando hospedeiros de diferentes famílias, entretanto a literatura atual demonstra uma mesma espécie ou um gênero de hospedeiro sendo parasitado por diferentes espécies de *Encotyllabe*, incluindo distribuições geográficas distintas. Todas essas variações levariam a acreditar na incompatibilidade da especificidade parasito-hospedeiro, porém não confirmada aqui, fato que só poderá ser confirmado através da revisão do grupo que poderia trazer novos dados para este âmbito. E o fato de parasitarem peixes migratórios como o *Pagrus pagrus* pode facilitar a dispersão do mesmo, justificando o registro do mesmo parasito em localidades tão distintas.

Porém no presente trabalho a especificidade quanto ao local parasitado foi positiva, já que a grande maioria coletada foi encontrada aderida às placas faríngeas e que nas brânquias foram encontrados somente parasitos soltos, fato que pode ser facilmente explicado pelo desprendimento do hospedeiro diante da morte deste, juntamente da proximidade das brânquias com as placas faríngeas.

Atualmente, na literatura há apenas o trabalho de Sepúlveda *et al.* (2014) referente a análise de COI (mtDNA) de *Encotyllabe*, e o mesmo descreveu *Encotyllabe antofagastensis* e *E. cheilodactyli* utilizando dados morfológicos moleculares. O presente estudo fornece informações de sequências de espécies ainda não depositadas, pois acredita-se que a análise molecular deve ser empregada juntamente com a morfologia para responder as inconsistências do grupo.

A presente análise molecular foi de completa concordância ao estudo morfológico, distinguindo as espécies aqui apresentadas, embora haja poucas sequências moleculares de *Encotyllabe* no GenBank, o que não nos permite a comparação molecular com muitas espécies, porém as presentes espécies apresentam características morfológicas nítidas para sua distinção

4. CONCLUSÕES GERAIS

- Embora a maioria das espécies de *Ergasilus* no Brasil tenham sido descritas na bacia amazônica, a descoberta de uma nova espécie do gênero nesta localidade, revela que sua diversidade ainda não é totalmente conhecida.
- Sobre o gênero *Encotyllabe* com os dados aqui obtidos podemos afirmar que os presentes parasitos não correspondem ao que foi proposto anteriormente na literatura, reforçando a necessidade de uma reavaliação do grupo.
- Escassos trabalhos referentes ao estudo filogenético do gênero *Encotyllabe*, geram a necessidade de novos estudos filogenéticos referentes ao grupo para melhor comparação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELHALIM, A. I.; LEWIS, J. W.; BOXSHALL, G. A. The life-cycle of *Ergasilus sieboldi* Nordmann (Copepoda: Poecilostomatoida), parasitic on British freshwater fish. **Journal of Natural History**, v. 25, n. 3, p. 559-582, 1991.
- ALMEIDA, K. S.; COHEN, S. C. Diversidade de monogenea (Platyhelminthes) parasitos de *Astyanax altiparanae* do reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu. **Saúde & Ambiente em Revista**, v. 6, n. 1, p. 31–41, 2011.
- AMATO, J. F. R.; BOEGER, W. A.; AMATO, S. B. Protocolos para Laboratório Coleta e Processamento de Parasitos de Pescado, Imprensa Universitária. Protocolos para Laboratório Coleta e Processamento de Parasitos de Pescado, Imprensa Universitária, 81pp., 1991.
- Amado M. A. P., Rocha C. E. F. 2001. Useful characters in identifying copepods of the genus *Ergasilus* from plankton, with the description of male and female of *E. sergipensis* n. sp. **Hydrobiologia**, 450, 149–157.
- ARAÚJO, C. S.; VARELLA, A. *Ergasilus coatiarus* sp. n. (Copepoda: Ergasilidae) parasita dos filamentos branquiais de *Cichla monoculus* Spix, 1831 (Perciformes: Cichlidae) da Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, v. 28, p. 417–424, 1998.
- BOEGER, W. A.; KRITSKY, D. C.; DOMINGUES, M. V.; BUENO-SILVA, M. The phylogenetic position of the Loimoidae Price, 1936 (Monogenoidea: Monocotylidea) based on analyses of partial rDNA sequences and morphological data. **Parasitology International**, v. 63, p. 492-499, 2014.
- BOXSHALL, G. A., DEFAYE, D. Global diversity of copepods (Crustacea: Copepoda) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, n. 1, p. 195–207, 2008.
- BOXSHALL, G. A.; HALSEY, S. H. An introduction to copepod diversity. The Ray Society, London, 966 pp, 2004.
- BOXSHALL, G. A.; MONTÚ, M. A. Copepods parasitic on Brazilian coastal fishes: a handbook. Nauplius, Rio Grande, 5, 225 pp., 1997.
- BOWLES, J.; HOPE, M.; TIU, W. U.; XUSHIAN, L.; MCMANUS, D. P. Nuclear and mitochondrial genetic markers highly conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*. **Acta Tropica**, v. 55, p. 217–229, 1993.
- BUSH, A. O.; FERNANDEZ, J. C.; ESCH, G. W.; SEED, J. R. Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press, 566 pp., 2001.
- CARVALHO, A. R.; LUQUE, J. L. Three new species of monogeneans parasitic on Atlantic cutlassfish *Trichiurus lepturus* (Perciformes: Trichiuridae) from Southeastern Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 3, p. 359–365, 2012.

CHAVES, N. D.; LUQUE, J. L. Ecology of metazoans parasites of *Menticirrhus americanus* (Osteichthyes: Sciaenidae), coast area from Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 8, n. 2, p. 137-144, 1999.

CHERO, J.; SÁEZ, G.; IANNAcone, J.; AQUINO, W. Ecological aspects of parasitic helminths of lorna drum *Sciaena deliciosa* (Tschudi, 1846) (Perciformes: Sciaenidae) acquired at the fishing terminal of ventanilla, Callao, Peru. **Neotrop. Helminthol.**, v. 8, n. 1, p. 59-76, 2014.

COHEN, S. C.; JUSTO, M. C. N.; KOHN, A. South american Monogeneoidea parasites of fishes, amphibians and reptiles. 663p. 2013

CORDEIRO, A. S.; LUQUE, J. L. Metazoários parasitos do coió *Dactylopterus volitans* (Linnaeus, 1758) (Osteichthyes: Dactylopteridae) do litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 27, n. 2, p. 119–123, 2005.

DOMINGUES, M. V. ; MARQUES, T. M. *Ergasilus trygonophilus* sp. nov. (Copepoda: Ergasilidae) a branchial parasite of freshwater stingrays (Potamotrygonidae) from state of Pará, Brazil. **Zoologia**, v. 27, p. 829–833, 2010.

EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. Diversidade dos parasitas de peixe de água doce do Brasil. 333p. 2010

EL-RASHIDY, H. H. Ergasilid copepods and grey mullet. PhD Thesis, University of London, 1999.

EL-RASHIDY, H.; BOXSHALL, G. A. Ergasilid copepods (Poecilostomatoida) from the gills of primitive Mugilidae (grey mullets). **Systematic Parasitology**, v. 42, p. 161–186, 1999.

EL-RASHIDY, H. H.; BOXSHALL, G. A. New species and new records of *Ergasilus Nordmann* (Copepoda: Ergasilidae) from the gills of grey mullet (Mugilidae). **Systematic Parasitology**, v. 51, p. 37–58, 2002.

EUZET, L.; COMBES, C. The selection of habitats among the Monogenea. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 1645-1652, 1998.

FÁBIO, S. Redescricao de *Encotyllabe lintoni* Monticelli, 1909 (Monogenea, Capsalidae) em *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758). **Boletim do Museu Nacional**, n. 385, p.1–5, 1998.

FERNÁNDEZ, J. Los parásitos de la lisa *Mugil cephalus* L. en Chile: sistemática y aspectos poblacionales (Perciformes: Mugilidae). **Gayana Zoología**, v. 51, p. 3–58, 1987.

FROESE, R.; PAULY D. (Eds.) FishBase. 2015. World Wide Web electronic publication. Disponível em : <www.fishbase.org>, version 04/2015. Acesso em: Setembro 2015.

GIBSON, D. (2015). **WoRMS editorial board. World Register of Marine Species.** <<http://www.marinespecies.org> > Acesso em: 20 de Novembro de 2015.

- HEBERT, P. D., A. CYWINSKA, S. L. BALL, AND J. R. DE WAARD. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceeding of the Royal Society of London Series B**, v. 270, p. 313–321, 2003.
- KABATA, Z. Parasitic Copepoda of British Fishes. The Ray Society, London, 468 pp, 1979.
- KEARN, G. C. Evolutionary expansion of the monogenea. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 8, p. 1227–1257, 1994.
- KEARN, G. C.; WHITTINGTON, I. D. **International Journal for Parasitology**, v. 22, n. 1, p. 119–121, 1992.
- KEENLEYSIDE, M. H. Cichlid Fishes, Behaviour, Ecology and Evolution. Vol. 2. Chapman & Hall, London, 378 pp, 1991.
- KHALIL, L. F.; ABDUL-SALAM, J. B. The subfamily Encotyllabinae (Monogenea: Capsalidae) with the description of *Alloencotyllabe caranxi* n. g., n. sp. and *Encotyllabe kuwaitensis* n. sp. **Systematic Parasitology**, v. 11, p. 139–150, 1988.
- KOHN, A.; ABRANSON, B.; MACEDO, B. Studies on some monogenean parasites of *Haemulon sciurus* (Shaw, 1803) (Pomadasyidae). **Journal of Helminthology**, v. 58, n. 3, p. 213–218, 1984.
- LINTON, Edwin. **Notes on parasites of Bermuda fishes**. Bermuda Biological Station for Research, 1907.
- LUQUE, J. L.; AMATO, J. F. R.; TAKEMOTO, R. M. Comparative analysis of the communities of metazoan parasites of *Orthopristis ruber* and *Haemulon steindachneri* (Osteichthyes: Haemulidae) from the southeastern Brazilian littoral: I. Structure and influence of the size and sex of hosts. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 56, p. 279–292, 1996.
- 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.
- LUQUE, J. L.; TAVARES, L. E. R. Checklist of Copepoda associated with fishes from Brazil. **Zootaxa**, v. 1579, p. 1–39, 2007.
- LUQUE, J. L.; VIEIRA, F. M.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C. Checklist of Crustacea parasitizing fishes from Brazil. **Check List**, v. 9, p. 1449–1470, 2013.
- MAMAEV, Y. L. Helminths of some commercial fish in the Gulf of Tonkin. Helminths of animals in south-eastern Asia. Helminths of some commercial fish in the Gulf of Tonkin. Helminths of animals in south-eastern Asia., 190pp., 1970.
- MARQUES, T. M.; BOEGER, W. A.; DE CARVALHO BRASIL-SATO M. 2015. Two new species of *Ergasilus* Nordmann, 1832 (Copepoda: Ergasilidae) and a redescription of *Ergasilus salmini* Thatcher & Brazil-Sato, 2008 from *Salminus brasiliensis* Cuvier and *S. franciscanus* Lima & Britsky (Teleostei: Characidae) in Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 90, p. 81–89, 2015.

- MENDOZA-PALMERO, C. A.; BLASCO-COSTA, I.; SCHOLZ, T. Molecular phylogeny of Neotropical monogeneans (Platyhelminthes: Monogenea) from catfishes (Siluriformes). **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 164, 2015.
- 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, 1980, 105p.
- MONTICELLI, F. S. Identificazione di una n. sp., del genere *Encotyllabe* (*lintonii* Montic.). **Bollettino della Società dei Naturalisti in Napoli**, v. 22, p. 86–88, 1909.
- MONTÚ M. A., BOXSHALL G. A. *Gauchergasilus*, a new genus for *Ergasilus euripedesi* Montú, 1980, an abundant parasitic copepod from the Patos Lagoon in southern Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 51, p. 21–28, 2002.
- MORALES-SERNA, F. N.; GÓMEZ, S.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. Parasitic copepods reported from Mexico. **Zootaxa**, 3234, p. 43–68, 2012.
- MURRAY, A. M. The fossil record and biogeography of the Cichlidae (Actinopterygii: Labroidei). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 74, p. 517–532, 2001.
- NADLER, S. A.; DE LEÓN, G. P. P. Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. **Parasitology**, v. 138, n. 13, p. 1688–1709, 2011.
- NOBLE, E. R. The Genus *Encotyllabe* (Class Trematoda) with a Description of a New Species. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 85, n. 1, pp.144–151, 1966.
- OLDEWAGE, W. H.; VAN AS, J. G. A key for the identification of African piscine parasitic Ergasilidae (Copepoda: Poecilostomatoida). **South African Journal of Zoology**, v. 23, p. 42–46, 1988.
- PARAGUASSÚ, A. R.; LUQUE, J. L.; ALVES, D. R. Community ecology of the metazoan parasites of red porgy, *Pagrus pagrus* (L., 1758) (Osteichthyes, Sparidae), from the coastal zone, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 461–467, 2002.
- POLETTO, A. B.; FERREIRA, I. A.; MELLO, D. C. C.; NAKAJIMA, R. T.; MAZZUCHELLI, J.; RIBEIRO, H. B.; VENERE, P. C.; NIRCHIO, M.; KOCHER, T. D.; MARTINS, C. Chromosome differentiation patterns during cichlid fish evolution. **BMC Genetics**, v. 11, p. 50–61, 2010.
- POULIN, R. Parasite biodiversity revisited: frontiers and constraints. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 9, p. 581–589, 2014.
- POULIN, R.; MORAND, S. The Diversity of Parasites. **The Quarterly Review of Biology**, v. 75, n. 3, p. 277–293, 2000.

PRICE, E. W. North American monogenetic trematodes. III. The family Capsalidae (Capsaloidea) **Journal of the Washington Academy of Sciences**, v. 29, n. 2, p. 63–92, 1939.

ROSIM, D. F.; BOXSHALL, G. A.; CECCARELLI, P. S. A novel microhabitat for parasitic copepods: a new genus of Ergasilidae (Copepoda: Cyclopoida) from the urinary bladder of a freshwater fish. **Parasitology International**, v. 62, p. 347–354, 2013.

SANTOS, C. P.; MOURÃO, E. D.; CÁRDENAS, M. Q. *Pseudempleurossoma gibsoni* n. sp., a new ancycrocephalid monogenean from *Paralonchurus brasiliensis* (Sciaenidae) from off the southeastern coast of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 2, p. 215–219, 2001.

SASAL P, DESDEVISES Y, MORAND S. Host-specialization and species diversity in fish parasites: phylogenetic conservatism? **Ecography**, v. 21, p.639–643, 1998.

SEPÚLVEDA, F. A.; GONZÁLEZ, M. T.; OLIVA, M. E. Two new species of *Encotyllabe* (Monogenea: Capsalidae) based on morphometric and molecular evidence: parasites of two inshore fish species of northern Chile. **Journal of Parasitology**. v. 100, n. 3, p. 344–349, 2014.

SHARMA, P.; AGARWAL, N.; KUMAR, S. Ribosomal DNA and morphological analysis of *Dactylogyrus* species from freshwater fishes of India. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 35, n. 2, p. 210–214, 2011.

SOARES, I. A.; VIEIRA, F. M.; LUQUE, J. L.. Parasite community of *Pagrus pagrus* (Sparidae) from Rio de Janeiro, Brazil: evidence of temporal stability. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 216–223, 2014.

SUÁREZ-MORALES, E.; SANTANA-PIÑEROS, A. M. 2008 A new species of *Ergasilus* (Copepoda: Cyclopoida: Ergasilidae) from coastal fishes of the Mexican Pacific. **Folia Parasitologica**, 55, 224–230, 2008.

TAVARES-DIAS M., DIAS-JÚNIOR M. B., FLORENTINO A. C., SILVA L. M., DA CUNHA A. C. Distribution pattern of crustacean ectoparasites of freshwater fish from Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 136–147, 2015.

THATCHER, V. E. *Ergasilus pitalicus*, new species (Copepoda: Poecilostomatoida: Ergasilidae), a gill parasite of a cichlid fish from the Pacific coast of Colombia. **Journal of Crustacean Biology**, v. 4, p. 495–501, 1984a.

THATCHER, V. E. The parasitic crustaceans of fishes from the Brazilian Amazon, 7. *Acusicola tucunarensis*, n. sp. (Copepoda: Cyclopoidea) from *Cichla ocellaris*, with an emendation of the genus and the proposal of Acusicolinae subfam. nov. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 44, p. 181–189, 1984b.

THATCHER, V. E. Copepods and fishes in the Brazilian Amazon. **Journal of Marine Systems**, v. 15, n. 1, p. 97–112, 1998.

THATCHER, V. E.; BOEGER, W. A. The parasitic crustaceans of fishes from the Brazilian Amazon. 4. *Ergasilus colomesus* n. sp. (Copepoda: Cyclopoida) from an ornamental fish,

Colomesus asellus (Tetraodontidae) and aspects of its pathogenicity. **Transactions of the American Microscopical Society**, v.102, p. 371–379, 1983.

THATCHER, V. E.; BRASIL-SATO, M. C. *Ergasilus salmini* sp. nov. (Copepoda: Ergasilidae) a branchial parasite of "dourado", *Salminus franciscanus* from the upper São Francisco River, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 3, p. 555–557, 2008.

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.

VIOLANTE-GONZÁLEZ, J.; AGUIRRE-MACEDO, M. L.; ROJAS-HERRERA, A. 2008. Comunidad de parásitos metazoarios de la charra *Cichlasoma trimaculatum* en la laguna de Tres Palos, Guerrero, México. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 79, p. 405–412, 2008.

WALTER, T.C.; BOXSHALL, G. (2015). **World of Copepods database. World Register of Marine Species**. <<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=128641>> Acesso em: 19 de Novembro.

WILLIAMS, A; BEVERLEY-BURTON, M. Redescription of Three Species of the Genus *Encotyllabe* (Capsalidae: Monogenea) from Fishes of the East Coast of Australia. **Australian Journal of Zoology**, v. 37, p. 45–53, 1989.

WHITTINGTON, I. D.; CRIBB, B. W.; HAMWOOD, T. E.; HALLIDAY, J. A. et al. Host-specificity of monogenean (platyhelminth) parasites: a role for anterior adhesive areas?. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 3, p. 305-320, 2000.

YAMAGUTI S. Studies on the helminth fauna of Japan. Part 2. Trematodes of fishes, I. **Japanese Journal of Zoology**, v. 5, n. 3, p. 249–541, 1934.

YAMAGUTI S. Parasitic copepods from fishes of Japan. Part 4. Cyclopoida. II. In: *Volumen Jubilare Professor Sadao Yoshida, II*. Osaka, pp. 392–578, 1939.