

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

TESE

Diagnose e filogenia molecular de digenéticos
Cladorchiidae (Paramphistomoidea) e
Cryptogonimidae (Opisthorchioidea) parasitos de
peixes dulcícolas na América do Sul

Camila Santos Pantoja de Oliveira

2019



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

**DIAGNOSE E FILOGENIA MOLECULAR DE DIGENÉTICOS
CLADORCHIIDAE (PARAMPHISTOMOIDEA) E
CRYPTOGONIMIDAE (OPISTHORCHIOIDEA) PARASITOS DE
PEIXES DULCÍCOLAS NA AMÉRICA DO SUL**

CAMILA SANTOS PANTOJA DE OLIVEIRA

Sob a Orientação do Professor
José Luis Fernando Luque Alejos

e Co-orientação do Professor
Tomáš Scholz

Tese submetida como
requisito parcial para obtenção
do grau de **Doutora em
Ciências** no Programa de pós-
graduação em Ciências
Veterinárias.

Seropédica, RJ
Março de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48d

Oliveira, Camila Santos Pantoja De, 16/12/1988-
Diagnose e filogenia molecular de digenéticos
Cladorchiidae (Paramphistomoidea) e Cryptogonimidae
(Opisthorchioidea) parasitos de peixes dulcícolas na
América do Sul / Camila Santos Pantoja De Oliveira. -
Seropédica, 2019.
125 f.

Orientador: José Luis Fernando Luque Alejos.

Coorientador: Tomáš Scholz.

Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências
Veterinárias, 2019.

1. Prospecção molecular. 2. Taxonomia. 3.
Filogenia. 4. Digenéticos parasitos de peixes
dulcícolas. I. Alejos, José Luis Fernando Luque,
22/02/1962-, orient. II. Scholz, Tomáš, 03/04/1960-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-graduação em Ciências
Veterinárias. IV. Título.

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

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

CAMILA SANTOS PANTOJA DE OLIVEIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências,
no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Tese aprovada em: / /


José Luis Fernando Luque Alejos, PhD, UFRRJ
(Orientador)


Alena Mayo Iniguez, PhD, Fiocruz


Cláudia Portes Santos Silva, PhD, Fiocruz


Raquel de Oliveira Simões, PhD, UFRRJ


Ricardo Massato Takemoto, PhD, UEM

*Aos meus pais, Jairo e Kátia,
e a minha avó, Luiza.*

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. José Luís Fernando Luque Alejos**, pela oportunidade de realizar esta pesquisa e pela confiança em meu trabalho. Obrigada pela orientação, por todo apoio e incentivo ao longo destes anos.

À **Dr^a. Arlene Jones**, por ter me introduzido no fascinante mundo da taxonomia dos cladorquídeos, por toda paciência, por compartilhar seu conhecimento acerca do grupo e por ter aceitado, gentilmente, a proposta de ir à República Tcheca para trabalharmos juntas.

Ao **Dr. Tomáš Scholz**, pelo suporte durante toda a pós-graduação, por me receber em seu laboratório diversas vezes, pela co-orientação, pelos valiosos ensinamentos e pela infinita disponibilidade.

Ao **Dr. Gerardo Perez-Ponce de León**, pela orientação durante o período sanduíche e por compartilhar todo o seu entusiasmo e ideias sobre as histórias taxonômicas dos digenéticos neotropicais.

À **Dr^a Aldenice Pereira** (IFAC), ao **Dr. Fernando Paiva** (UFMS), ao **Dr. Luiz Eduardo Roland Tavares** (UFMS), ao **Dr. Marcos Tavares Dias** (Embrapa-AP), ao **Msc. Marcos Sidney** (Embrapa-AP) e ao **Dr. Ricardo Massato Takemoto** (UEM), por todo o apoio durante as inúmeras coletas que foram fundamentais para a realização deste projeto.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, em especial, à **Dr^a. Rita de Cássia Alves Alcântara de Menezes**, por me introduzir ao mundo da Parasitologia através da orientação na Iniciação Científica, à **Dr^a Cláudia Portes Santos Silva**, pelo suporte no início da pós-graduação e ao **Dr. Douglas McIntosh**, por todo conhecimento compartilhado na área de biologia molecular em seu laboratório.

Aos amigos (que já passaram e que permanecem) do Laboratório de Parasitologia de Peixes, **Bruno Telles, Celso Cruces, Diego Flores, Fabiano Matos, Fabiano Paschoal, Felipe Bisaggio, Iris Soares, Jhon Chero, Philippe Alves, Sara Coelho e Vivian Suane**, pelo agradável convívio e por tornarem essa caminhada mais fácil.

Às amigas mais que especiais, **Bianca Soares, Carla Sardella, Juliana Moreira, Letícia Gabriela Vidal, Naraiana Taborda e Viviane Zeringóta**, por todo companheirismo, amizade e suporte nessa jornada.

Aos amigos do Laboratório de Helmintologia da Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), em especial, à **Ana Santacruz**, ao **David Iván Hernandez-Mena**, à **Brenda Solorzano**, ao **Carlos Mendoza-Palmero**, à **Letícia Ramirez**, à **Maria Letícia**, ao **Alejandro Ocegüera** e ao **Jonathan Granilho**, pelo carinho e por tornarem o período “sanduíche” tão acolhedor.

Às amigas, **Ana Carolina de Holanda Cantalice** (UFPE), **Berenice Ruiz** (UNAM), **Bianca Pires** (UFRJ) e **Patieene Alves** (UFRJ), pela amizade e companheirismo durante minha estadia no México.

Aos amigos do Instituto de Parasitologia da República Tcheca, **Aline Angelina Acosta**, **Roman Kuchta**, **Simona Georgieva**, **Jesus Hernández-Orts** e **Miroslava Soldánová**, por todo o suporte e ensinamentos durante minha estadia em České Budějovice.

Às técnicas de laboratório, **Blanka Škoríková** e **Martina Borovková** do Instituto de Parasitologia, assim como, **Berenit Mendoza-Garfias** e **Laura Margarita Marquez** da UNAM, por todo apoio técnico que foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto.

Aos curadores das coleções helmintológicas visitadas durante este projeto, por cederem, gentilmente, espécimes de digenéticos, **Marcelo Knoff** (CHIOC), **Luis García Prieto** (UNAM), **Célio Ubirajara Magalhães Filho** (INPA), **Helmut Sattmann** e **Stefan Szeiler** (NHMW).

Aos funcionários do PPGCV, **Arthur**, **Ivan**, **Keila**, **Maurício**, **Tássia** e **Vanessa**, por sempre estarem dispostos a nos ajudar.

Aos meus irmãos, **Ariel**, **Carolina** e **Diego**, pela torcida e pela total cumplicidade.

A toda **minha família**, pelo carinho, confiança e pelos momentos que não estivemos juntos e souberam entender.

A **CAPES** e ao **CNPq**, pelo suporte financeiro para a realização da pesquisa.

Por fim, gostaria de agradecer à **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro** e ao **Departamento de Parasitologia Animal**, por abrirem as portas para que eu pudesse desenvolver esta pesquisa. Proporcionaram-me conhecimento científico e crescimento pessoal.

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

Resumo

De Oliveira, Camila Santos Pantoja. **Diagnose e filogenia molecular de digenéticos Cladorchiidae (Paramphistomoidea) e Cryptogonimidae (Opisthotchioidea) parasitos de peixes dulcícolas na América do Sul.** 2019. 112p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Estudos morfológicos e genéticos de digenéticos parasitos de peixes da América do Sul são de grande relevância para contribuir para o conhecimento dessa fauna ainda pouco explorada, para permitir a validação da maioria dos delineamentos clássicos dos táxons e esclarecer áreas onde a abordagem clássica sozinha falhou. O presente estudo teve como objetivo principal estudar digenéticos das famílias Cladorchiidae e Cryptogonimidae parasitos em peixes dulcícolas da América do Sul usando ferramentas de taxonomia integrativa. Entre 2003 e 2018 foram feitas necropsias de peixes provenientes de diferentes bacias nessa região. Depois de capturados, os peixes foram analisados para coleta dos parasitos. Os digenéticos encontrados foram estudados por microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e através de análises moleculares. Foram estudados também, exemplares de cladorquídeos e cryptogonimídeos (tipos e vouchers) depositados em coleções helmintológicas. No capítulo I, o gênero *Goeldamphistomum* foi proposto para acomodar *Goeldamphistomum amazonum* e *G. peruanum*. O gênero *Iquistotrema* foi proposto para acomodar *Iquistotrema papillatum*. Essas três novas espécies de Cladorchiidae foram descritas em peixes Siluriformes da bacia do Amazonas, Peru. No capítulo II, a primeira análise filogenética de cladorquídeos foi realizada a partir de sequências de 28S rDNA, ITS2 rDNA e *cox1* mtDNA. Quatorze espécies foram encontradas em peixes Characiformes, Perciformes e Siluriformes no Brasil e no Peru, sendo três ainda não conhecidas pela ciência, uma espécie de *Microrchis* sp. em *Pimelodella cristata*, uma espécie de *Pronamphistoma* sp. em *Heros* sp. e *Pseudocladorchis* sp. em *Pterodoras granulosus*. No capítulo III, foi gerada uma sequência parcial de 28S rDNA de *Pseudosellacotyla lutzii* parasito de *Hoplias malabaricus* e sua posição na análise filogenética dentro Cryptogonimidae foi confirmada corroborando com a última classificação proposta. Detalhes do seu tegumento foram observados pela primeira vez através de MEV. No capítulo IV, *Acanthostomum gnerii* (Cryptogonimidae) foi estudado através de sequências de 28S rDNA, *cox1* mtDNA e MEV. Este é o primeiro registro da espécie no rio Marapanim, Pará, Brasil. A descoberta de três novos gêneros, seis novas espécies e o fornecimento de dados moleculares inéditos para quatorze espécies mostram o quanto ainda é incipiente nosso conhecimento acerca dos cladorquídeos e cryptogonimídeos na América do Sul.

Palavras-chave: Prospecção molecular, Sistemática, Trematoda, Peixes dulcícolas

Abstract

De Oliveira, Camila Santos Pantoja. **Diagnosis and molecular phylogeny of digeneans Cladorchiidae (Paramphistomoidea) and Cryptogonimidae (Opisthotchioidea) parasites of freshwater fishes in South America.** 2019. 112p. Thesis. (Doctor of Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Morphological and genetic studies of digeneans parasites of fishes in South American are great relevance in order to contribute to the knowledge of this fauna that has not yet been explored, to allow the validation of most of the classic delineation of the taxa and to clarify areas where the classical approach alone has failed. The present work aimed to study the digeneans of the Cladorchiidae and Cryptogonimidae parasites of freshwater fishes in South America using tools of integrative taxonomy. Between 2003 and 2018 fish from different basins in this region were necropsied. After being captured, the fish were analyzed for parasite collection. The digeneans found were studied by light microscopy, SEM and through molecular analysis. Cladorchiids and cryptogonimids (types and vouchers) deposited in helminthological collections were also studied. In the chapter I, the genus *Goeldamphistomum* was proposed to accommodate *Goeldamphistomum amazonum* and *G. peruanum*. The genus *Iquistostrema* was proposed to accommodate *Iquistostrema papillatum*. These three new species of Cladorchiidae were described in Siluriformes fishes in the Amazon basin, Peru. In the Chapter II, the first phylogenetic analysis of cladorchiids was performed from 28S rDNA, ITS2 rDNA and *cox1* mtDNA sequences. Fourteen species were found in Characiformes, Perciformes and Siluriformes fishes in Brazil and Peru, being three new for the science, *Microrchis* sp. in *Pimelodella cristata*, *Pronamphistoma* sp. from *Heros* sp. and *Pseudocladorchis* sp. in *Pterodoras granulatus*. In the Chapter III, a partial sequence was generated of 28S rDNA of *Pseudosellacotyla lutzi* parasite of *Hoplis malabaricus* and the position in phylogenetic analysis within Cryptogonimidae was confirmed corroborating with the last proposed classification. Details of their tegument were observed for the first time through SEM. In Chapter IV, *Acanthostomum gnerii* (Cryptogonimidae) was studied through 28S rDNA, *cox1* mtDNA sequences and SEM. This is the first record of the species in the Marapanim river, Pará, Brazil. The descriptions of three new genera, six new species and new molecular data for fourteen species show how still incipient our knowledge about cladorchiids and cryptogonimids in South America.

Key-words: Molecular prospecting, Systematic, Trematoda, Freshwater fishes

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I.

Tabela 1. Medidas (em micrômetros) de *Goeldamphistomum amazonum* e *G. amazonum* parasitos de peixes Siluriformes na bacia do Amazonas, Peru16

CAPÍTULO II.

Tabela 1. Lista de paranfistomoides cujas sequências foram utilizadas para análises e sequências de cladorquídeos obtidas no presente estudo coletados no Brasil e no Peru.....36

Tabela 2. Medidas (em micrômetros) de *Microorchis* sp. coletados em diferentes hospedeiros coletados no Brasil e no Peru41

Tabela 3. Medidas de *Pseudocladorchis* sp. coletados em diferentes hospedeiros no Brasil e no Peru60

CAPÍTULO III.

Tabela 1. Digenéticos usados na análise filogenética (28S rDNA) em ordem alfabética por espécie com o número de acesso do GenBank, hospedeiro, localização geográfica e referência bibliográfica dos isolados81

CAPÍTULO IV.

Tabela 1. Digenéticos usados na análise filogenética (28S rDNA) com o número de acesso do GenBank, hospedeiro, localização geográfica e referência bibliográfica dos isolados.101

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I.

Figura 1. *Goeldamphistomum amazonum* de *Goeldiella eques* (hospedeiro-tipo) (A, B, D) e *Tenellus trimaculatus* (C). A, holótipo, vista ventral; B, faringe, vista lateral (parátipo); C, ductos terminais genitais, vista ventral (parátipo); D, acetábulo, vista ventral, com ventosa acessória (parátipo).13

Figura 2. *Goeldamphistomum peruanum* de *Duopalatinus peruanus* (hospedeiro tipo) (A–C, E, F) e *Calophysus macropterus* (D, G). A, holótipo, vista ventral; B, faringe, vista ventral (holótipo); C, D, ductos genitais terminais, vista ventral e lateral, respectivamente. E–G, acetábulo com ventosa acessória em vista lateral, ventral e lateral, respectivamente.15

Figura 3. *Iquitostrema papillatum* de *Hassar orestis*. A, holótipo, vista ventral (observe o acetábulo com papilas na superfície luminal). B, faringe, vista ventral (parátipo); C, ductos terminais genitais, vista ventral (holótipo).24

CAPÍTULO II.

Figura 1. *Microrchis* sp. de *Pimelodella cristata* (Müller & Troschel), Brasil; vista ventral (A); *Pronamphistoma* sp. de *Heros* sp., Brasil; vista ventral (B)44

Figura 2. Micrografias de *Dadayius pacuensis* Thatcher, Sey & Jégu, 1996 coletado em *Metynnys lippincottianus* (Cope), Brasil (A–C) e *Dadaytrema gracile* Lunaschi, 1989 em *Pimelodella gracilis* (Valenciennes), Brasil (D–H). A, vista ventral; B, acetábulo com cristas transversais na superfície luminal; C, poro genital mostrando a ausência de uma ventosa genital; D, vista ventral; E, extremidade anterior mostrando a distribuição das papilas; F, poro genital; G, detalhes de uma única papila da extremidade anterior; H, acetábulo.48

Figura 3. Micrografias de *Dadaytrema minimum* Vaz, 1932 coletado em *Tocantinsia piresi* (Miranda Ribeiro), Brasil (A–E) e *Dadaytrema oxycephalum* (Diesing, 1836) em *Pterodoras granulosus* (Valenciennes) ambas as espécies coletadas em Mato Grosso do Sul, Brasil (F–J). A, vista ventral; B, uma única papila da extremidade anterior; C, extremidade anterior mostrando a distribuição das papilas; D, acetábulo; E, poro genital; F – vista ventral; G, extremidade anterior mostrando a distribuição das papilas; H, papilas da região anterior; I, uma única papila da extremidade anterior; I – acetábulo mostrando o entalhe posterior. 51

Figura 4. A–B – *Doradamphistoma bacuense* Thatcher, 1999 de *Megalodoras uranoscopus* (Eigenmann & Eigenmann), Brasil; A, extremidade anterior; B, acetábulo de um parátipo (INPA 372c)54

Figura 5. *Myleustrema concavatum* coletado em *Myloplus rubripinnis* (Müller & Troschel), Brasil. A – vista ventral. B–D – *Pseudocladorchis* sp. coletado em *Pterodoras granulosus* (Valenciennes), Peru (B, D) e *Oxydoras niger* (Valenciennes), Peru (C). B – vista ventral do holótipo (IPCAS D-801/1); C – extremidade anterior com poro genital, vista ventra do parátipo (IPCAS D-801/4); D – genitália terminal do holótipo (IPCAS D-801/1).59

Figura 6. Micrografias (MEV) de *Doradamphistoma parauchenipteri* (Lunaschi, 1989) comb. n. coletado em *Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus), Brasil (A–B), *Doradamphistoma bacuense* em *Megalodoras uranoscopus* (Eigenmann & Eigenmann), Brasil (C–D) e *Pseudocladorchis* sp. em *Pterodoras granulosus* (Valenciennes), Peru (E).

A – vista ventral; B – extremidade anterior mostrando a distribuição das papilas; C – parte anterior, abertura oral e poro genital; D – entalhe posterior do acetábulo; E – acetábulo; ausência de entalhe posterior61

Figura 7. Árvore bayesiana da análise filogenética de 28S rDNA de cladorquídeos parasitos de peixes dulcícolas no Brasil e no Peru. O primeiro número mostra os valores de bootstrap (ML – 1.000 replicações); o segundo número representa o suporte dos ramos pela probabilidade posterior (4×10^6 generations; burn-in = 4×10^3). *Diplodiscus subclavatus* foi usado como grupo externo65

Figura 8. Árvore bayesiana da análise filogenética das sequências de *cox1* mtDNA de cladorquídeos parasitos de peixes dulcícolas do Brasil e Peru. O número representa o suporte dos ramos pela probabilidade posterior (4×10^6 generations; burn-in = 4×10^3). A árvore foi gerada sem raiz.....66

Figura 9. Árvore bayesiana da análise filogenética de ITS2 rDNA de cladorquídeos parasitos de peixes dulcícolas no Brasil e no Peru. O primeiro número mostra os valores de bootstrap (ML – 1.000 replicações); o segundo número representa o suporte dos ramos pela probabilidade posterior (4×10^6 generations; burn-in = 4×10^3). *Calicophoron microbothrium* foi usado como grupo externo67

CAPÍTULO III.

Figura 1. Análise filogenética de alguns membros da ordem Plagiorchiida estimada por MV e IB usando sequências parciais de 28S rDNA mostrando a posição de *Pseudosellacotyla lutzi*. O ID da sequência do GenBank segue o nome da espécie.84

Figura 2. A-D. Microscopia eletrônica de varredura de *Pseudosellacotyla lutzi* (Freitas, 1941) Yamaguti, 1954. **A**, adulto, vista ventral; **B**, superfície da região anterior de *P. lutzi*; **C**, detalhe dos espinhos pectinados da região anterior mostrando 8 projeções digitiformes; **D**, detalhe dos espinhos da região posterior mostrando 3 projeções digitiformes. Barras de escala: A = 50 μ m, B = 25 μ m, C = 5 μ m, D = 10 μ m.85

CAPÍTULO IV.

Figura 1. Micrografias de *Acanthostomum gnerii* Szidat (1954) coletado em *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), Brasil (**A-D**). **A**, vista ventral; **B**, extremidade anterior mostrando os espinhos no tegumento e o acetábulo; **C**, ventosa oral cercada por espinhos; **D**, corte transversal ao meio do corpo; ovos.103

Figura 2. Árvore bayesiana da análise filogenética de 28S rDNA de criptogonimídeos. O número representa o suporte dos ramos pela probabilidade posterior (4×10^6 generations; burn-in = 4×10^3). *Opistorchis noverca* foi usado como grupo externo.....104

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
CAPÍTULO I. Novos gêneros e espécies de Cladorchiidae (Digenea: Paramphistomoidea) parasitos de peixes da bacia do Amazonas, Peru	6
1. Introdução	9
2. Material e Métodos	10
2.1. Coleta de material	10
2.2. Análise morfológica	10
3. Resultados	11
4. Discussão	24
5. Referências bibliográficas	26
CAPÍTULO II. Primeiro estudo filogenético molecular de digenéticos cladorquídeos (Digenea: Paramphistomoidea) parasitos de peixes neotropicais, incluindo descrições de três novas espécies e novos registros geográficos e de hospedeiros	29
1. Introdução	32
2. Material e Métodos	32
2.1. Coleta de material	32
2.2. Análise morfológica	33
2.3. Análise molecular	33
2.3.1. Extração, amplificação e sequenciamento de DNA	33
2.3.2. Análise filogenética	34
3. Resultados	38
4. Discussão	68
5. Referências bibliográficas	70
CAPÍTULO III. Posição filogenética de <i>Pseudosellacotyla lutzi</i> (Freitas, 1941) (Digenea: Cryptogonimidae) parasito de <i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch) na América do Sul, através de sequência de 28S rDNA e novas observações da ultraestrutura de seu tegumento	74
1. Introdução	77
2. Material e Métodos	77
2.1. Coleta de material	77
2.2. Análise morfológica	78
2.3. Análise molecular	78
2.3.1. Extração, amplificação e sequenciamento de DNA	78
2.3.2. Análise filogenética	79
3. Resultados	79

4. Discussão	85
5. Referências bibliográficas	89

CAPÍTULO IV. Diagnóstico morfológico e molecular de *Acanthostomum gnerii* Szidat, 1954 (Digenea: Cryptogonimidae) parasitando *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae), Pará, Brasil.....95

1. Introdução	98
2. Material e Métodos	98
2.1. Coleta de material	98
2.2. Análise morfológica	99
2.3. Análise molecular	99
2.3.1. Extração, amplificação e sequenciamento de DNA	99
2.3.2. Análise filogenética	100
3. Resultados	103
4. Discussão	105
5. Referências bibliográficas	107

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....110

ANEXOS111

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os parasitos são extremamente abundantes e de natureza diversa, representando uma parcela substancial da biodiversidade global. Pelo menos 50% das espécies que vivem na terra são parasitas de alguma forma, considerando todos os vírus e algumas bactérias, e as espécies eucarióticas mais comumente associadas à parasitologia, incluindo agentes de doenças que afetam não apenas humanos, mas também o gado, cultivos e vida selvagem (BROOKS; HOBERG, 2006).

Entre os metazoários em que o parasitismo é conhecido, estão inclusos membros dos filos Acanthocephala, Nematoda, Mollusca, Anellida, Arthropoda e Platyhelminthes, cada qual com características intrínsecas a este modo de vida (POULIN; MORAND, 2000).

Os Platyhelminthes Gegenbaur, 1859 são caracterizados por serem acelomados, possuírem o corpo dorsoventralmente achatado com simetria bilateral e a maioria ser hermafrodita. O filo apresenta a maior riqueza de espécies, possuindo mais de 40.000 táxons descritos dentro do grupo monofilético formado pelos Neodermata Ehlers, 1984 (Cestoda Rudolphi, 1808, Monogenea Van Beneden, 1858, Trematoda Rudolphi, 1808), que incluem somente organismos adaptados ao parasitismo (CRIBB et al., 2003; POULIN; MORAND, 2004). Este grupo é caracterizado por apresentar uma reposição parcial ou total do tegumento celular dos adultos, por uma camada sincicial não celular denominada neoderme, o que facilitou a adaptação à vida parasitária. (OLSON; TKACH, 2005).

Dentre os Neodermata, Trematoda é a classe com o maior número de táxons. O grupo compreende duas subclasses, Aspidogastrea Faust & Tang, 1936 e Digenea Carus, 1863 (OLSON; TKACH, 2005). Os primeiros formam um grupo pequeno, com apenas 61 espécies válidas e são parasitos de moluscos, peixes e quelônios (ROHDE, 2001, 2002; ALVES et al., 2015), com um ciclo de vida relativamente simples e uma posição basal na sistemática dos Trematoda (LITTLEWOOD, 2006). Já a subclasse Digenea compreende um grande e diverso grupo de helmintos endoparasitos (~18.000 espécies), possuindo um ciclo de vida complexo, com a utilização de no mínimo um hospedeiro invertebrado e um vertebrado, embora possam exibir até quatro hospedeiros (CRIBB et al., 2011; CRIBB et al., 2003); são encontrados em todas as classes de vertebrados, mas são menos diversos em agnatos e condrictes (CRIBB et al., 2011; BRAY; CRIBB, 2003).

Os digenéticos, quando adultos, exigem uma exuberância de formas morfológicas. Essas variações podem ser observadas na posição e forma das ventosas, aparelho digestório e do sistema reprodutor (NOLAN; CRIBB, 2005). Várias espécies causam perdas econômicas através de infecções em animais domésticos. Outras espécies infectam seres humanos e causam graves complicações médicas, como a esquistossomose, que é uma das doenças parasitárias mais importantes em termos de impactos na saúde pública (LEWIS; TUCKER, 2014).

Estudos sobre Trematoda na América do Sul começaram no século XIX por helmintologistas europeus com material coletado no Brasil, principalmente por Olfers, Sello e Natterer. Entre estes estão Rudolphi, Diesing e Brandes (KOHN et al., 2007). A primeira espécie descrita parasitando peixe nessa região foi *Physochoerus tubulatus* (Rudolphi, 1819) em *Muraena* sp. no Brasil.

Nos últimos anos, alguns levantamentos de trematódeos parasitos em peixes dulcícolas sul-americanos foram publicados por diferentes autores e se mostraram extremamente necessários para compreender melhor a diversidade do grupo nesta região (ver VIANA, 1924; TRAVASSOS et al., 1969; THATCHER, 2006; KHON et al., 2007; LUQUE et al., 2016; CHOUDHURY et al., 2016). Dentre estes trabalhos, destaca-se o

estudo feito por Choudhury et al., (2016), em particular por Nuñez e Santos, pois os dados mostram que o conhecimento de trematódeos recebeu consideravelmente pouca atenção, visto a diversidade de hospedeiros nesta região e também em relação as outras partes do continente americano.

Segundo Reis (2013), a América do Sul abriga a mais diversa fauna de peixes dulcícola do mundo com mais 4.000 espécies distribuídas pelas diferentes bacias hidrográficas da região (Amazonas, Orinoco e Paraguai, entre outras). Essa alta biodiversidade de peixes regionais nos leva a esperar também uma alta diversidade de trematódeos parasitos de peixes, porém, ao passo que apenas 5% da fauna desses hospedeiros foram examinados para coleta de parasitos, fica difícil prever a diversidade total deste grupo (CHOUDHURY et al., 2016).

No contexto dos estudos moleculares, fica mais evidente o quanto ainda deve ser feito para contribuir para o conhecimento deste grupo. Poucos trabalhos nesta região foram publicados usando técnicas de sequenciamento de DNA, ao passo que a utilização dessas técnicas se encontra amplamente difundida em outras regiões (ver OLSON, 2003; NOLAN; CRIBB, 2005; OLSON; TKACH, 2005; RAZO-MENDIVIL et al., 2015; TKACH et al., 2018).

Estudos morfológicos e genéticos de digenéticos parasitos de peixes da América do Sul são de grande relevância para contribuir para o conhecimento dessa fauna ainda pouco explorada, para permitir a validação da maioria dos delineamentos clássicos dos táxons e esclarecer áreas onde a abordagem clássica sozinha falhou.

Dentre as famílias de digenéticos com espécies representativas em peixes na América do Sul, Cladorchiidae e Cryptogonimidae estão entre as cinco com maior riqueza, a primeira com 32 e a segunda com 16 espécies (CHOUDHURY et al., 2016). Apesar de estarem em destaque, são duas famílias pouco exploradas na região.

Embora o esteio da sistemática de Digenea seja através de análises morfológicas de adultos em vertebrados (BLAIR et al., 1996) e a maioria das descrições de espécies se baseia nesse tipo de análise juntamente com hospedeiros preferenciais e distribuição geográfica, a análise morfológica sozinha pode ser insuficiente para inequivocamente identificar muitas espécies (NOLAN; CRIBB, 2005). Alguns fatores, tais como, o pequeno tamanho dos adultos, escassez de caracteres morfológicos, incerteza sobre a validade desses caracteres, alta similaridade morfológica entre espécies estreitamente relacionadas, plasticidade fenotípica, espécies crípticas e especiação recente, podem contribuir para uma identificação equivocada (LUTON et al., 1992; LEON-REGAGNON et al., 1999; SCHULENBURG et al., 1999; TKACH et al., 2000 GALAZZO et al., 2002; RAZO-MENDIVIL et al., 2015);

Em virtude do exposto, o presente trabalho teve como objetivo principal fazer a diagnose de digenéticos cladorquídeos e cryptogonimídeos parasitos de peixes dulcícolas no Brasil e Peru usando ferramentas de análises morfológica e molecular. Para melhor compreensão deste estudo, o trabalho apresentou objetivos mais específicos, tais como: descrever novos gêneros e espécies novas para a ciência, realizar uma prospecção molecular de digenéticos provenientes de grandes bacias hidrográficas sul-americanas, observar possíveis padrões de distribuição geográfica e padrões de associação parasito-hospedeiro e elucidar relações filogenéticas. Os resultados obtidos foram divididos em quatro capítulos que visaram responder as diferentes questões sobre esses digenéticos parasitos de diversas espécies de peixes dulcícolas na América do Sul.

1.1.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, P. V.; VIEIRA, F. M.; SANTOS, C. P.; SCHOLZ, T.; LUQUE, J. L. A checklist of the Aspidogastrea (Platyhelminthes: Trematoda) of the world. **Zootaxa**, v. 3918, n. 3, p. 339–396, 2015.

BLAIR, D.; CAMPOS, A.; CUMMINGS, M. P.; LACLETTE, J. Evolutionary biology of parasitic platyhelminths: the role of molecular phylogenetics. **Parasitology Today**, v. 12, n. 2, p. 66–71, 1996.

BRAY, R. A.; CRIBB, T. H. The digeneans of elasmobranchs-distribution and evolutionary significance. In: Combes C, Jourdane J (eds) Taxonomie, écologie et évolution des métazoaires parasites. (Livre hommage à Louis Euzet). Tome 1. PUP, Perpignan, France, 2003.

BROOKS, D. R.; HOBERG, E. P. Systematics and Emerging Infectious Diseases: from Management to Solution. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 2, p. 426- 429, 2006.

CRIBB, T. H.; BRAY, R. A.; LITTLEWOOD, D. T. J.; PICHELIN, S.; HERNIOU, E. A. Relationships of the Digenea - evidence from molecules and morphology. In: Littlewood DTJ, Bray RA (eds) Interrelationships of the Platyhelminthes. Taylor & Francis, London 11, 2001.

CRIBB, T. H.; BRAY, R. A.; OLSON, P. D.; LITTLEWOOD, D. T. J. Life cycle in the Digenea: a new perspective from phylogeny. **Advances in Parasitology**, v. 54, p. 197–254, 2003.

CRIBB, T. H.; ADLARD, R. D.; HAYWARD, C. J.; BOTT, N. J.; ELLIS, D.; EVANS, D.; NOWAK, B. F. The life cycle of *Cardicola forsteri* (Trematoda Aporocotylidae), a pathogen of anched southern bluefin tuna. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 48, p. 861–870, 2011.

CHOU DHURY, A.; AGUIRRE-MACEDO, M. L.; CURRAN, S. S.; OSTROWSKI DE NUÑEZ, M., OVERSTREET, R. M.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; et al. Trematode diversity in freshwater fishes of the Globe II: 'New World'. **Systematic Parasitology**, v. n. 93, p. 271–282, 2016.

GALAZZO, D. E.; DAYANANDAN, S. D.; MARCOGLIESE, D. J.; McLAUGHLIN, J. D. Molecular systematics of some North American species of *Diplostomum* (Digenea) based on rDNA-sequence data comparisons with European congeners. **Canadian Journal of Zoology**, v. 80, n. 12, p. 2207–2217, 2002.

KOHN, A.; FERNANDES, B. M. M.; COHEN, S. C. South American trematodes parasites of fishes, Rio de Janeiro, Brazil, p. 318, 2007.

LEÓN-RÉGAGNON, V.; BROOKS, D. R.; PÉREZ-PONDE DE LEÓN, G. Differentiation of Mexican species of *Haematoloechus* Looss 18299 (Digenea: Plagiorchiformes): molecular and morphological evidence. **Journal of Parasitology**, v. 85, n. 5, p. 935–946.

- LEWIS F. A.; TUCKER M. S. Schistosomiasis. In: Toledo R., Fried B. (eds) Digenetic Trematodes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Springer, New York, v. 766, p 47–75, 2014.
- LUQUE, J. L., PEREIRA, F. B., ALVES, P. V., OLIVA, M. E., TIMI, J. T. Helminth parasites of South American fishes: current status and characterization as a model for studies of biodiversity. **Journal of Helminthology**, v. 91, n. 2, p. 150–164, 2016.
- LUTON, K.; WALKER, D.; BLAIR, D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda Digenea). **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 56, n. 2, p. 323–327, 1992.
- 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. 101–63, 2005.
- POLIN, R.; MORAND, S. The diversity of parasites. **The Quarterly Review of Biology**, v. 75, n. 3, p. 277–93, 2000.
- POULIN, R.; MORAND, S. Parasite Biodiversity. **Smithsonian Books**, Washington, DC, 2004.
- RAZO-MENDIVIL, U.; ROSAS-VALDEZ, R.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. A new cryptogonimid (Digenea) from the Mayan cichlid, *Cichlasoma urophthalmus* (Osteichthyes: Cichlidae), in several localities of the Yucatán Peninsula, Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 6, p. 1371–1378, 2008.
- ROHDE, K. The Aspidogastrea: an archaic group of Platyhelminthes. In: Littlewood DTJ, Bray RA (eds) Interrelationships of the Platyhelminthes. Taylor & Francis, London, 2001.
- ROHDE, K. Subclass Aspidogastrea Faust & Tang, 1936. In: Gibson DI, Jones A, Bray RA (eds) **Keys to the Trematoda**, CAB International, Wallingford, v. 1, 2002
- SCHULENBURG, J. H. G. v. d.; ENGLISCH, U.; WÄGELE, J. W. Evolution of ITS1 rDNA in the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda): 3' end sequence conservation and its phylogenetic utility. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, n. 1, p. 2–12, 1997.
- OLSON, P. D.; CRIBB, T. H.; TKACH, V. V.; BRAY, R. A.; LITTLEWOOD, D. T. J. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). **International Journal of Parasitology**, v. 33, p. 733–755, 2003.
- OLSON, P. D.; TKACH, V. V. Advances and trends in the molecular systematic of the parasitic platyhelminths. **Advances in Parasitology**, v. 60, p. 165–243, 2005.
- TKACH, V.; PAWLOWSKI, J.; MARIAUX, J. Phylogenetic analysis of the suborder Plagiorchiata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial lsrDNA sequences. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 83–93, 2000.
- TKACH, V. V.; ACHATZ, T. J.; HILDEBRAND, J.; GREIMAN, S. E. Convolved history and confusing morphology: Molecular phylogenetic analysis of dicrocoeliids reveals true systematic position of the Anenterotrematidae Yamaguti, 1958 (Platyhelminthes, Digenea). **Parasitology International**, v. 67, n. 4, p. 501–508, 2018.

THATCHER, V.E. Amazon Fish Parasites. Second edition. Aquatic Biodiversity in Latin America. **Pensoft, Sofia & Moscow**, v. 1, 508 p, 2006.

TRAVASSOS, L.; FREITAS, J. F. T.; KOHN, A. Trematódeos do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 67, p. 886, 1969.

VIANA, L. Tentativa de catalogação das espécies brasileiras de trematódeos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 17, n. 1, p. 95–227, 1924.

Capítulo I

Novos gêneros e espécies de Cladorchiidae (Digenea: Paramphistomoidea) parasitos de peixes da bacia do Amazonas, Peru¹

¹ Artigo publicado: Pantoja, C.; Scholz, T.; Luque, J. L.; Jones, A. 2018. New genera and species of paramphistomes (Digenea: Paramphistomoidea: Cladorchiidae) parasitic in fishes from the Amazon basin in Peru. **Systematic Parasitology** 95: 611–624 (Anexo I).

Resumo

Dois novos gêneros e três espécies novas de digenéticos paranfistomoides foram descritos na família Cladorchiidae Fiscoeder, 1901 de peixes doradídeos, heptapterídeos, pimelodídeos e pseudopimelodídeos no Rio Amazonas no Peru. *Goeldamphistomum amazonum* Pantoja, Scholz, Luque & Jones, 2018 (espécie-tipo) de *Goeldiella eques* (Müller & Troschel) (hospedeiro-tipo) e *Tenellus trimaculatus* (Boulenger) e *Goeldamphistomum peruanum* Pantoja, Scholz, Luque & Jones, 2018 de *Duopalatinus peruanus* Eigenmann & Allen (hospedeiro-tipo), *Calophysus macropterus* (Lichtenstein) e *Microglanis* sp. Ambas as espécies possuem uma ventosa acessória no acetábulo, o que distingue o gênero de todos os outros relatados anteriormente em peixes de água doce na América do Sul. Elas diferem uma do outra principalmente porque *G. amazonum* tem um poro genital pré-bifurcal e testículos oblíquos separados, cujos níveis raramente se sobrepõem longitudinalmente, enquanto *G. peruanum* possui o poro genital pós-bifurcal e testículos obliquamente tandem. *Iquitostrema papillatum* Pantoja, Scholz, Luque & Jones, 2018 (Kalitrematinae Travassos, 1933) do intestino de *Hassar orestis* (Steindachner) difere de outros membros da subfamília na combinação de um acetábulo maciço com a superfície luminal com papilas e testículos simétricos que cobrem o ceco próximo ao arco cecal. Estes são os primeiros registros de paranfistomoides nas cinco espécies hospedeiras aqui estudadas.

Palavras-chave: Taxonomia, Morfologia, Digenea

Abstract

Two new genera and three new species of digeneans paramphistomes are described in the family Cladorchiidae Fiscoeder, 1901 from doradid, heptapterid, pimelodid and pseudopimelodid fishes in the Amazon River in Peru. *Goeldamphistomum amazonum* Pantoja, Scholz, Luque & Jones, 2018 (type-species) from *Goeldiella eques* (Müller & Troschel) (type-host) and *Tenellus trimaculatus* (Boulenger), and *Goeldamphistomum peruanum* Pantoja, Scholz, Luque & Jones, 2018 from *Duopalatinus peruanus* Eigenmann & Allen (type-host), *Calophysus macropterus* (Lichtenstein) and *Microglanis* sp. are placed in the Dadayiinae Fukui, 1929. Both species have an accessory acetabular sucker, which distinguishes the genus from all taxa previously reported from South American freshwater fishes. They differ from each other primarily in that *G. amazonum* has a prebifurcal genital pore and oblique, separated testes, the levels of which rarely overlap longitudinally, whereas *G. peruanum* has a postbifurcal genital pore and testes directly to obliquely tandem. *Iquitostrema papillatum* Pantoja, Scholz, Luque & Jones, 2018 (Kalitrematinae Travassos, 1933) from the intestine of *Hassar orestis* (Steindachner) differs from other members of the subfamily in the combination of a massive acetabulum with a papillate luminal surface and symmetrical testes which overlie the caeca close to the caecal arch. These are the first records of paramphistomes from the five host species studied here.

Key-words: Taxonomy, Morphology, Digenea

1. Introdução

A bacia do Rio Amazonas é um “hot spot” de biodiversidade com uma extraordinária riqueza de peixes (ALBERT; REIS, 2011) que servem como hospedeiros intermediários e definitivos de numerosos grupos de parasitos, incluindo os helmintos achatados como os digenéticos (THATCHER, 2006).

Um dos mais impressionantes grupos desses parasitos é composto pelos paranfistomoides, que são digenéticos que pertencem à superfamília Paramphistomoidea Fiscoeder, 1901, que são relativamente raros em peixes de outras regiões zoogeográficas.

Os paranfistomoides são caracterizados pela ausência de uma ventosa oral e pela posição posterior de um largo acetábulo (JONES, 2005). São cosmopolitas e parasitam todas as classes de vertebrados. São mais comuns em peixes dulcícolas do que em peixes marinhos, e apenas um gênero ocorre em aves.

Dos que parasitam gado doméstico, como por exemplo, espécies dos gêneros *Paramphistomum* Fiscoeder, 1901, *Calicophoron* Näsmark, 1937 ou *Cotylophoron* Stiles & Goldberger, 1910 são consideradas patogênicas (KASSAI, 1999).

A maioria dos representantes de Paramphistomoidea na América do Sul pertence à família Cladorchiidae Fiscoeder, 1901. Membros dessa família são caracterizados por um conjunto de estruturas morfológicas que incluem a presença de sacos faringeanos primários pareados, dois testículos, ventosa ventral ausente, saco do cirro geralmente presente, ausência de modificações especiais nos ductos terminais genitais e o ovário é pós-testicular ou, raramente, intertesticular (ver chave de famílias de Paramphistomoidea de Jones (2005a).

Cladorquídeos e outros paranfistomoides parasitos de peixes de água doce possuem distribuição geográfica irregular, com a maioria das espécies ocorrendo na Região Neotropical, especialmente na bacia do Rio Amazonas. Um total de 32 espécies em 22 gêneros de cladorquídeos foi descrito na América do Sul, o que faz com que Cladorchiidae seja a segunda família com a maior riqueza de espécies na América do Sul em peixes (LACERDA et al., 2003; CHOUDHURY et al., 2016).

Paranfistomoides têm sido reportados em peixes de cinco ordens e 13 famílias (THATCHER, 2006), com a maioria dos registros sendo no Brasil (MUNIZ-PEREIRA et al., 2009). Poucos registros estão disponíveis em outros países sul americanos, incluindo Argentina, Colômbia, Guiana Francesa, Peru e Venezuela. No Peru, apenas duas espécies foram reportadas: *Dadaytrema* sp. parasitando o caracídeo *Piaractus brachypomus* (Cuvier) e *Pseudocladorchis ferrumequinum* (Diesing, 1836) parasitando um doradídeo não identificado (THATCHER, 2006; LUQUE et al., 2016; OSTROWSKI DE NUÑEZ et al., 2017). A ventosa acessória no acetábulo não está presente em membros destes gêneros, como foi confirmado pelo estudo de tipos e vouchers de táxons congêneros (veja abaixo a lista de espécimes estudados no museu).

O ciclo de vida dos paranfistomoides inclui somente um hospedeiro intermediário, um caramujo pulmonado de onde grandes cercarias “amphistomatous” (com um acetábulo largo na extremidade posterior do corpo) emergem. Elas encistam na vegetação e são ingeridas por potenciais hospedeiros definitivos, como no caso dos paranfistomoides de peixes, espécies herbívoras ou onívoras, como peixes Characiformes ou Siluriformes (THATCHER, 1993; 2006).

Durante as coletas de helmintos parasitos de peixes de água doce na Amazônia peruana que ocorreram entre 2004 e 2011, cladorquídeos foram encontrados em peixes

Siluriformes. Esses resultados revelaram a presença de três novas espécies em dois novos gêneros que são descritos no presente capítulo.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta de material

Os peixes foram coletados por pescadores locais ou comprados nos mercados de peixes em Belém, Iquitos, Região de Loreto, Peru, em 2004, 2006, 2008 e 2011. Eles foram examinados com o auxílio de microscópio estereoscópio para coleta dos parasitos. Os parasitos coletados foram lavados em solução salina e fixados em formalina aquecida (4%) ou em etanol absoluto para estudos moleculares. Os espécimes fixados em formalina aquecida foram transferidos para etanol 70% para posteriores estudos morfológicos. Nomenclatura e classificação dos hospedeiros foram feitas seguindo Froese & Pauly (2018).

2.2. Análise morfológica

Os espécimes fixados em formalina aquecida foram corados com Carmalúmem de Mayer e foram desidratados em uma série ascendente de concentrações etílicas. Posteriormente, foram clarificados com eugenol (óleo de cravo) e montados em bálsamo do Canadá em lâminas permanentes. Durante a montagem de algumas lâminas, alguns espécimes ficaram deslocados lateralmente e algumas estruturas, como o poro genital, podem ter sido deslocadas da linha média.

Os desenhos foram feitos usando um tubo acoplado no microscópio BX51 Olympus. As medidas foram feitas usando o software cellSens Dimension adaptado ao microscópio Olympus SZX16 e foram dadas em micrômetros, exceto quando indicado de outra forma; dados métricos foram dados com o intervalo seguido pela média entre parênteses.

Para comparação, os seguintes vouchers de cladorquídeos da coleção do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas em Manaus, Brasil (INPA) foram estudados: (H, holótipo; P, parátipo; V, voucher): *Alphamphistoma canoeforma* Thatcher & Jégu, 1996 (H: 185; P: 186a-f); *Anavilhatrema robusta* Thatcher, 1992 (H: 458; P: 459a-h); *Annelamphistoma elegans* Thatcher & Jégu, 1996 (P: 201a-d); *Betamphistoma jariense* Thatcher & Jégu, 1996 (H: 187; P: 188a-f); *Colocladorchis ventrastomis* Thatcher, 1979 (H: 039; P: 040a-d); *Curimatrema microscopica* Thatcher, 2000 (H: 373; P: 374a-h); *Dadayius pacuensis* Thatcher, Sey & Jégu, 1996 (H: 202; P: 203a-f); *Dadayius puruensis* Lopes, Karling, Takemoto, Rossoni, Ferreira & Pavanelli, 2011 (H: 595; P: 596a-c); *Dadaytrema compacta* (Thatcher & Jégu, 1996) (sin. *Zetamphistoma compacta*) (H: 193; P: 194a-f); *Dadaytrema oxycephalum* (Diesing, 1836) Travassos, 1931 (V: 043a-h); *Dadaytremoides grandistomis* Thatcher, 1979 (H: 041; P: 042a-c); *Deltamphistoma pitingaense* Thatcher & Jégu, 1996 (H: 191; P: 192a-f); *Doradamphistoma bacuensis* Thatcher, 1999 (H: 371; P: 372a-h); *Gammamphistoma collaris* Thatcher & Jégu, 1996 (H: 189; P: 190a-e); *Inpamphistoma papillatum* Thatcher, Sey & Jégu, 1996 (P: 199a-c); *Micramphistoma ministoma* Thatcher, 1992 (H: 452; P: 453a-b); *Myleustrema concavatum* Thatcher & Jégu, 1998 (H: 206; P: 207a-i); *Pacudistoma guianensis* Thatcher & Jégu, 1998 (H: 204; P: 205a-f); *Pseudocladorchis*

cylindricus (Diesing, 1836) Daday, 1907 (V: 195a-e); *Pacudistoma turgida* Thatcher, 1992 (H: 456; P: 457a-h); *Pronamphistoma cichlasomae* Thatcher, 1992 (H: 454; P: 455a-l).

Holótipo e parátipos das espécies descritas aqui foram depositados na Coleção do Centro de Biologia da Academia de Ciências da República Tcheca (IPCAS) e no Museu de História Natural de Londres, Inglaterra (NHMUK).

3. Resultados

Superfamily Paramphistomoidea Fiscoeder, 1901

Family Cladorchiidae Fiscoeder, 1901

Subfamily Dadayiinae Fukui, 1929

***Goeldamphistomum* Pantoja, Scholz, Luque & Jones, 2018**

Diagnose: Corpo pequeno, delicado, oval alongado, afilado anteriormente. Largura máxima no meio do corpo. Acetábulo com entalhe póstero-medial e com ventosa acessória. Papilas tegumentares presentes, quase imperceptíveis em torno da extremidade anterior. Abertura oral terminal. Faringe com sacos extramurais primários pareados. Esôfago estreito, quase reto. Bulbo esofágico presente. Cecos quase diretos, com leve ondulação, terminando bem próximos ao acetábulo. Dois testículos intercecais no terço médio do corpo; oblíquos ou diretamente oblíquo-tandem, contíguos ou amplamente separados; margens inteiras, mas irregulares. Vesícula seminal externa bem desenvolvida. Saco do cirro de parede fina, contendo vesícula seminal interna (porção proximal) e células prostáticas (porção distal). Ventosa genital verdadeira ausente. Poro genital mediano (às vezes, ligeiramente deslocado), pré-bifurcal ao nível do bulbo esofágico ou pós-bifurcal e distintivamente posterior ao arco cecal. Ovário mediano ou submediano, entre as extremidades cecais, oval e irregular. Glândula de Mehlis quando observada aparece mais ou menos póstero-ventral ao ovário. Canal de Laurer não observado. Útero forma alça descendente e a parte ascendente se sobrepõe ao ceco. Receptáculo seminal uterino ocasionalmente observado na parte descendente. Numerosos ovos ou relativamente poucos aparecendo grande em relação ao tamanho do corpo. Folículos vitelínicos em dois campos laterais que se estendem logo após o nível do testículo posterior para além das extremidades dos cecos, quase ao nível do acetábulo; ocasionalmente alguns folículos vitelínicos podem estar presentes em linha média, mas em campos não confluentes. Vesícula excretora e poro geralmente não observados; quando parcialmente visível, póstero-dorsal ao acetábulo. Em heptapterídeos, doradídeos, pimelodídeos e pseudopimelodídeos, Peru.

Espécie tipo: *Goeldamphistomum amazonum* Pantoja, Scholz, Luque & Jones, 2018

Etimologia: O nome genérico refere-se ao gênero do hospedeiro tipo.

Registro no ZooBank: 73A5CE6D-60C5-4E8E-8075-278A025B8B0E

***Goeldamphistomum amazonum* Pantoja, Scholz, Luque & Jones, 2018**

Figura 1. A–D

Descrição baseada em seis espécimes coletado em *G. eques* e um espécime coletado em *T. trimaculatus*; as medidas estão apresentadas na tabela 1.

Corpo pequeno, delicado, oval alongado, afilado anteriormente. Largura máxima no meio do corpo. Acetábulo pequeno ventro-subterminal com entalhe póstero-medial com ventosa acessória. Papilas tegumentares presentes, quase imperceptíveis em torno da extremidade anterior. Abertura oral terminal. Faringe pequena com sacos extramurais primários. Esôfago estreito, quase reto. Bulbo esofágico presente distinto, mas delgado, não muito desenvolvido. Cecos razoavelmente em linha reta, terminando bem próximos ao acetábulo. Dois testículos oblíquos, não contíguos, geralmente não se sobrepõem longitudinalmente; testículo anterior próximo à bifurcação cecal; margem lateral de um ou ambos os testículos podem cobrir o ceco adjacente; aproximadamente ovais, margens inteiras, mas irregulares. Vesícula seminal externa bem desenvolvida cruza o arco cecal à esquerda da bifurcação. Saco do cirro com paredes finas contém vesícula seminal interna (porção proximal) e células prostáticas (porção distal). Ventosa genital verdadeira ausente. Poro genital pré-bifurcal ao nível do bulbo esofágico, cercado por células de coloração densa. Ovário oval irregular, mais ou menos entre a terminação cecal. A glândula de Mehlis parece ser póstero-ventral ao ovário. Canal de Laurer não observado. Útero com porção descendente; a porção ascendente invade o ceco. Receptáculo seminal uterino ocasionalmente observado na porção descendente. Poucos ovos, largos em relação ao tamanho do corpo, colapsados em todas as montagens. Folículos vitelínicos em dois campos laterais começando apenas posteriormente ao nível dos testículos e estendendo-se posteriormente as extremidades cecais quase até o nível do acetábulo. Alguns folículos dispersos podem estar presentes na linha intermediária entre as extremidades cecais, mas não confluentes. Vesícula excretora e poro excretor não observados.

Hospedeiro tipo: *Goeldiella eques* (Müller & Troschel) (Siluriformes: Heptapteridae) (Códigos dos hospedeiros: PI 256b, PI 405a (holótipo), PI 426a).

Outros hospedeiros: *Tenellus trimaculatus* (Boulenger) (Siluriformes, Doradidae) (código dos hospedeiros PI 169a; IPCAS D-769/2).

Localidade tipo: Rio Nanay em Santa Clara próximo a Iquitos, Província Maynas, Região de Loreto, Peru (03° 46' 59"S, 73° 20' 32"O).

Outra localidade: Iquitos, Peru (Bacia do Rio Amazonas) (localidade precisa do hospedeiro PI 169a é desconhecida).

Sítio de infecção: intestino

Parâmetros de infecção: *G. eques*: 30 peixes examinados, três infectados, cada peixe com um máximo de três digenéticos (seis no total); *T. trimaculatus*: dois peixes examinados, um infectado com um digenético.

Série tipo: Holótipo e três parátipos (IPCAS D-769/1); 1 parátipo (NHMUK 2018.6.14.1).

Registro no ZooBank: 588C6245-E69F-4FCD-B24 B-B9EC4887D478.

Etimologia: O nome da espécie refere-se à área da coleta (Bacia do Rio Amazonas)

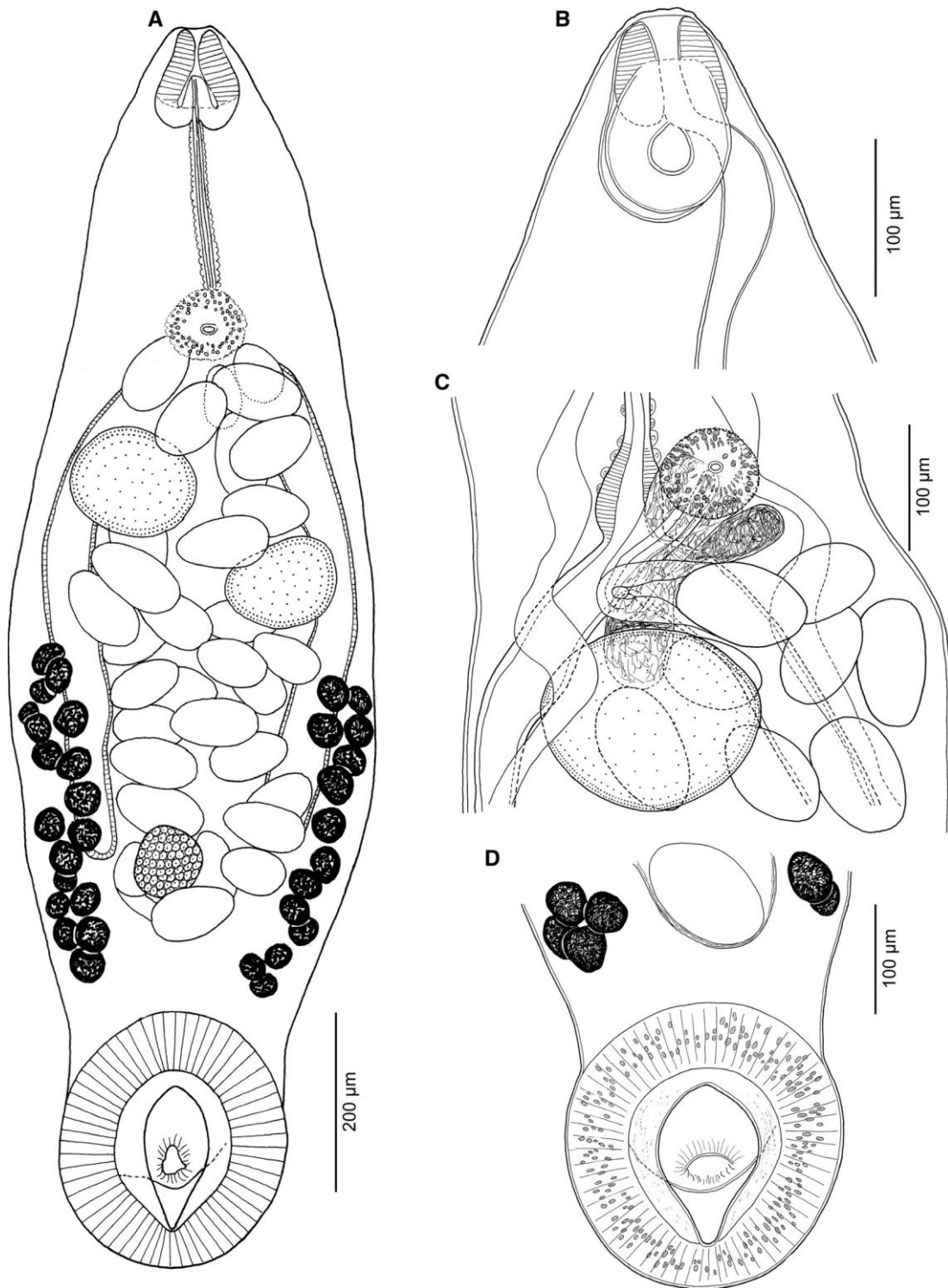


Figura 1. *Goeldamphistomum amazonum* de *Goeldiella eques* (hospedeiro-tipo) (**A**, **B**, **D**) e *Tenellus trimaculatus* (**C**). **A**, holótipo, vista ventral; **B**, faringe, vista lateral (parátipo); **C**, ductos genitais, vista ventral (parátipo); **D**, acetábulo, vista ventral, com ventosa acessória (parátipo).

***Goeldamphistomum peruanum* Pantoja, Scholz, Luque & Jones, 2018**

Figura 2. A–D

Descrição baseada em quatro espécimes coletado em *Duopalatinus peruanus* e em dois espécimes coletados em *Calophysus macropterus*; as medidas estão na tabela 1.

Corpo pequeno, cônico anteriormente e largura máxima na metade posterior. Acetábulo com ventosa acessória e entalhe póstero-medial. Papilas tegumentares inconspícuas presentes na extremidade anterior. Faringe delicada, com sacos extramurais primários pareados. Esôfago estreito, delicado. Bulbo esofágico delgado presente. Bifurcação cecal na parte anterior do corpo. Cecos intestinais ligeiramente sinuosos, terminando próximos ao acetábulo. Os dois testículos são irregulares, intercecais e diretamente oblíquo tandem; o nível de suas margens internas sempre se sobrepõe um ao outro longitudinalmente em linha média, não contíguo, amplamente separado do arco cecal e do ovário. Vesícula seminal externa bem desenvolvida. Saco do cirro pós-bifurcal, largamente oval, contém vesícula seminal (parte proximal) e células prostáticas (parte distal). Poro genital mediano, claramente pós-bifurcal, cercado por células inconspícuas densamente coradas. Ovário redondo, ventral, entre e aproximadamente no nível da terminação cecal. Glândula de Mehlis, quando visível, mais ou menos póstero-dorsal ao ovário. Canal de Laurer não observado. Porção descendente de útero distendido, próximo ao ovário, forma receptáculo seminal uterino em alguns espécimes. A porção ascendente invade lateralmente o ceco, mas não muito, se invade, lateralmente entre eles. Metratermo ventral em relação ao saco do cirro. Ovos numerosos, a maioria colapsada. Folículos vitelínicos em campos laterais estreitos ao longo do ceco entre o nível da margem posterior do testículo posterior para além das extremidades cecais, alcançando a borda do acetábulo ou não. Vesícula excretora parcialmente visível em um espécime, ântero-dorsal ao acetábulo com ducto excretor direcionado para a superfície póstero-dorsal.

Hospedeiro tipo: *Duopalatinus peruanus* Eigenmann & Allen (Siluriformes, Pimelodidae) (Código do hospedeiro PI 430a).

Outros hospedeiros: *Calophysus macropterus* (Lichtenstein) (Siluriformes, Pimelodidae) (código do hospedeiro PI 101a; IPCAS D-770/2); *Microglanis* sp. (Siluriformes, Pseudopimelodidae) (código do hospedeiro PI 338a; IPCAS D-770/3).

Localidade tipo: Rio Nanay em Santa Clara, próximo a Iquitos, Província de Maynas, Região de Loreto, Peru (03° 46' 59"S, 73° 20' 32"O).

Sítio de infecção: intestino.

Parâmetros de infecção: *D. peruanus*: dois peixes examinados, um infectado com sete digenéticos; *C. macropterus*: 35 peixes examinados, um infectado com três digenéticos; *Microglanis* sp.: um peixe examinado, infectado com 2 digenéticos.

Material tipo: Holótipo e 2 parátipos (IPCAS D-770/1); 1 parátipo (NHMUK 2018.6.14.2).

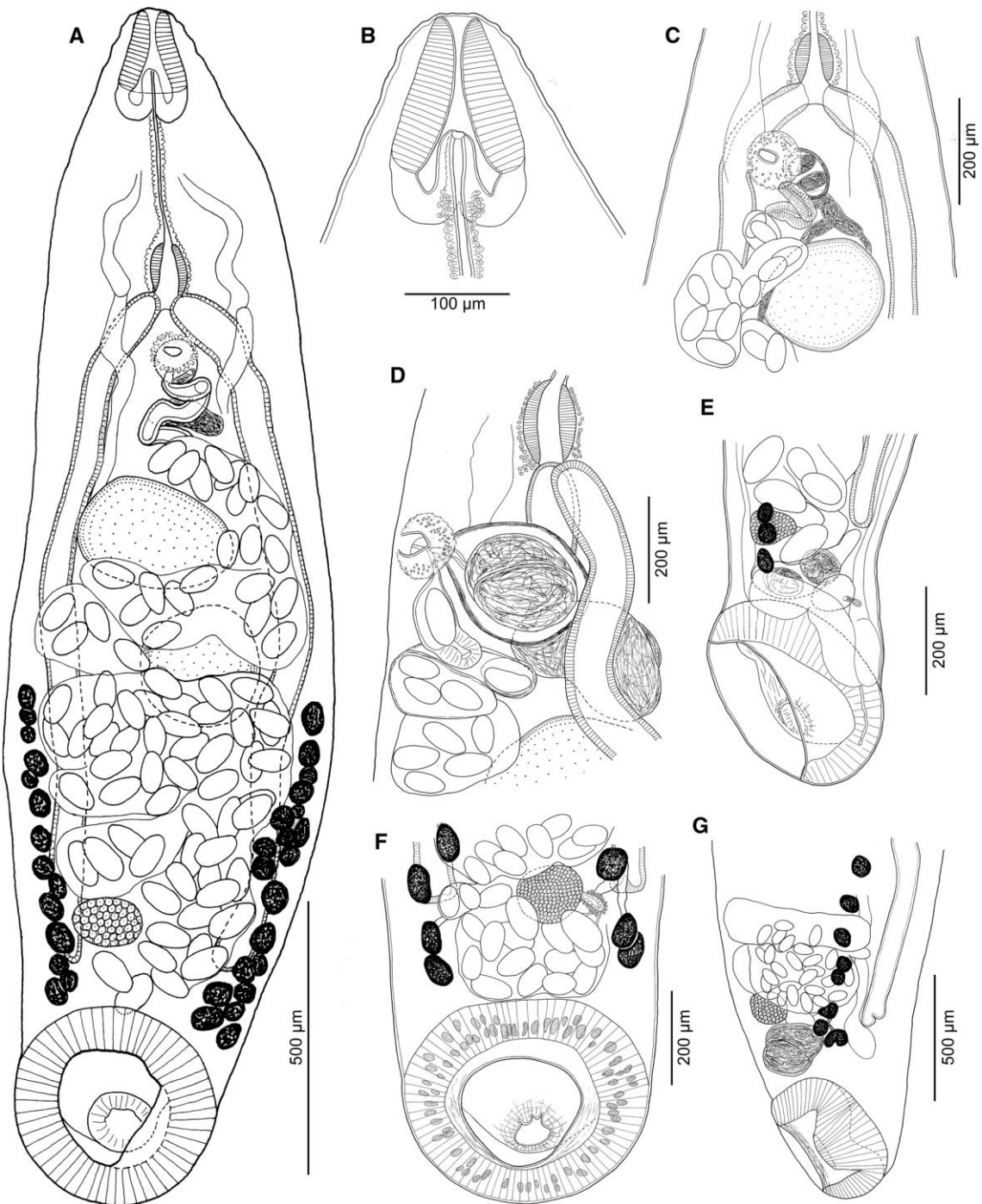


Figura 2. *Goeldamphistomum peruanum* coletado em *Duopalatinus peruanus* (hospedeiro tipo) (A–C, E, F) e *Calophysus macropterus* (D, G). A, holótipo, vista ventral; B, faringe, vista ventral (holótipo); C, D, ductos genitais terminais, vista ventral e lateral, respectivamente. E–G, acetábulo com ventosa acessória em vista lateral, ventral e lateral, respectivamente.

Table 1. Medidas (em micrômetros) de *Goeldamphistomum amazonum* e *G. peruanum* parasitos de peixes Siluriformes na bacia do Amazonas, Peru.

Espécie	<i>Goeldamphistomum amazonum</i>	<i>G. amazonum</i>	<i>Goeldamphistomum peruanum</i>	<i>G. peruanum.</i>	<i>G. peruanum</i>
Hospedeiro	<i>Goeldiella eques</i>	<i>Tenellus trimaculatus</i>	<i>Duopalatinus peruanus</i>	<i>Calophysus macropterus</i>	<i>Microglanis</i> sp.
Espécimes	6	1	4	2	2
Comp total	1.298–1.661 (1.441)	1.579	1.915–2.610 (2.251)	3.383-3.414	2.044–2.061
Largura máxima	255–408 (347)	389	587–702 (646) n = 3	777	446–460
Comp acetábulo	249–368 (305)	299	349–448 (397)	439–440	356–357
Largura acetábulo	217–277 (253)	300	281–530 (404)	495	255–341
Comp faringe	54–128 (78)	86	121–140 (131)	143-149	119–135
Largura faringe	68–90 (80)	94	87–161 (129)	105–121	111–113
Saco faringeano (direito)	32–47 (39) n = 5	38	60–77 (69)	87	53–58
Saco faringeano (esquerdo)	44–31 (37) n = 5	40	61–72 (67)	94	54–74
Esôfago	262–341 (302)	411	184–380 (310)	296–553	210–345
Bulbo esofágico	49–100 (81) n = 5	97	89–130 (113)	172–172	75–106
Bifurcação cecal até a extremidade anterior	365–466 (406) [28%]	420 (27%)	438–565 (502) [23%]	666–722 (21%)	343–490 (21%)
Ceco (direito)	430–895 (594)	882	874–1.439 (1.193)	2.025-2.334	715–1.069
Ceco (esquerdo)	475–862 (595)	974	952–1.520 (1.230)	1.970–1961	671–1.072
Testículo anterior (comp)	67–112 (91)	126	172–215 (187) n = 3	239	112–192
Testículo anterior (largura)	71–139 (107)	126	222–276 (247) n = 3	268	159–215
Testículo posterior (comp)	80–121 (95)	110	184–189 (186) n = 3	272	73–193

Testículo posterior (largura)	75–157 (119)	96	196–247 (227) n = 3	223	120–183
Comp ovário	62–86 (73) n = 5	92	62–128 (99)	123–134	85
Largura ovário	65–118 (85) n = 5	96	72–137 (113)	149–131	63
Ovos	Colapsados	Colapsados	103 × 61 n = 1	Colapsados	Colapsados

Comentários: As características das três espécies descritas neste trabalho são consistentes com as características de Paramphistomoidea Fiscoeder, 1901 e com membros de Cladorchiidae Fiscoeder, 1901. As principais características distintivas e mais detalhes estão em outras publicações (ver Jones, 2005a-m). A sistemática da superfamília Paramphistomoidea e da família Cladorchiidae devem ser revisadas quando dados moleculares suficientes estiverem disponíveis para esses grupos.

A falta de várias modificações dos ductos terminais masculinos encontrados em membros de outras famílias faz com que as novas espécies encontradas no Peru sejam diferentes de membros de Paramphistomidae Fiscoeder, 1901, Brumptiidae Stunkard, 1925, Choerocotyloididae Yamaguti, 1971, Gastrothylacidae Stiles & Goldberger, 1901, Gastrodiscidae Monticelli, 1892, Olveriidae Yamaguti, 1958, Stephanopharyngidae Stiles & Goldberger, 1910 e Zygocotylidae Ward, 1917.

Ambas as espécies possuem sacos faríngeos primários que distinguem de espécies de Paramphistomidae, Gastrothylacidae e Zonocotylidae Yamaguti, 1963, que não possuem sacos faríngeos de qualquer tipo. Distinguem de espécies de Stephanopharyngidae, que possuem um único saco massivo e distinguem de espécies de Brumptiidae e Gastrodiscidae, que possuem um bulbo esofágico e sacos faríngeos secundários pareados.

Membros das famílias Cladorchiidae, Balanorchiidae Stunkard, 1925, Diplodiscidae Cohn, 1904, Olveriidae Yamaguti, 1958 e Zygocotylidae possuem sacos faríngeos primários pareados. As espécies descritas neste trabalho diferem das espécies de Zygocotylidae, como descrito acima e das espécies de Olveriidae pela ausência de uma estrutura incomum e atípica do sistema alimentar de olverídeos, que compreende um alongado e muscular esôfago e alongados cecos que são mais longos que o corpo. Os membros de Balanorchiidae são caracterizados por uma única estrutura dos ductos genitais terminais, variadamente interpretados como um saco do cirro protusível ou um saco hermafrodita com uma papila genital. Trematódeos da família Diplodiscidae são caracterizados por possuírem um único testículo, sendo que todos os espécimes peruanos estudados neste trabalho possuem dois. Os presentes espécimes diferem das espécies de Gastrothylacidae pela ausência de uma bolsa ventral, que caracteriza espécies dessa família.

Não há registros prévios de cladorquídeos em *Goeldiella eques*, *Tenellus trimaculatus*, *Duopalatinus peruanus*, *Calophysus macropterus* ou *Microglanis* sp. no Peru ou em outro lugar na América do Sul que possuam esse caráter atípico, a ventosa acessória no acetábulo. A presença ou ausência deste caráter tem sido usada em nível genérico por Sey (1983, 1991) e Jones (2005g). O termo é usado aqui porque a característica geralmente tem a aparência de uma ventosa pouco desenvolvida; também tem sido referenciado na literatura como uma proeminência central ou muscular, pedúnculo ou protuberância. Espécimes com esse caráter foram encontrados em todas as cinco espécies de hospedeiros estudadas aqui e que foram coletadas no Peru.

O tipo de acetábulo nessas espécies descritas se assemelha ao “tipo diplodiscus” de Näsmark (1973) ou ao “tipo megalodiscus” de Sey (1983) na macroscopia morfológica, mas exames histológicos seriam necessários para melhor caracterização. Esses tipos são semelhantes aos relatados em parafistomoides de anfíbios e répteis nas Américas do Norte e Central, Europa, Ásia, África e Austrália (ver Sey, 1991), porém não foram classificados como “tipos”. Diante nosso conhecimento, este tipo de acetábulo não foi encontrado anteriormente em cladorquídeos parasitos de peixes.

A presença ou ausência de uma ventosa acessória no acetábulo não foi considerada significativa em nível de família por Sey (1991) ou Jones (2005b), mas tem

sido usado em nível genérico e de subfamília por Sey (1991) e em nível de gênero por Jones (2005b, g). Sey (1988, 1991) propôs a subfamília Megalodiscinae, caracterizada principalmente pela presença de uma ventosa acessória no acetábulo em Cladorchiidae para *Megalodiscus* (sin. *Pseudodiplodiscus* Yamaguti, 1923) e *Opisthodiscus* Cohn, 1904. *Megalodiscus* é parasito de anfíbios e raramente de répteis nas Américas do Norte e Central e *Opisthodiscus* de anfíbios na Europa e Norte da África. Jones (2005b) sinonimizou Megalodiscinae com Schizamphistominae Looss, 1912, considerando o caráter de valor duvidoso para nível acima de gênero.

Junto com seus diferentes hospedeiros e distribuição geográfica, os espécimes aqui encontrados não podem ser acomodados em nenhum dos gêneros citados acima com esse caráter. *Megalodiscus* difere em ter um acetábulo maciço muito mais largo que o corpo na maioria das espécies e *Opisthodiscus* têm testículos mais ou menos simétricos e campos vitelínicos extensos entre os níveis faringeano e acetabular.

Como dito anteriormente, a alocação na família Diplodiscidae Cohn, 1904, que contém três gêneros com uma ventosa acessória no acetábulo, é uma possibilidade excluída porque seu diagnóstico principal é a presença de um único testículo. O único diplodiscídeo de peixes de água doce da América do Sul, *Pseudodiplodiscus cornu* (Diesing, 1839) Manter, 1962 de peixes doradídeos no Brasil, possui um único testículo e não possui a ventosa acessória no acetábulo.

Portanto, acredita-se que os espécimes atuais representem um novo gênero de cladorquídeo e enquanto se aguarda revisão da família são classificados como membros da subfamília Dadayiinae Fukui, 1929. Eles são impedidos de pertencer a outras subfamílias por uma combinação de caracteres, incluindo: ausência de um ovário intertesticular e de campos de folículos vitelínicos restritos (Colocladorchiinae Sey, 1988); vesícula excretora não intertesticular (Solenorchiinae Hilmy, 1949); ausência de modificações nos ductos genitais terminais (Osteochilotrematinae Jones & Leong, 1986); sacos faríngeanos extramurais não bipartidos em estrutura (Helostomatinae Skrjabin, 1949); e os testículos são intercaecais ao invés de um intercecal e um extracecal (Sandoniinae Ukoli, 1972). Eles não possuem extensas alças uterinas extracecais como em Travassosiniinae Sey, 1988. Táxons das subfamílias citadas acima são parasitos de peixes. Os Cladorchiinae Fiscoeder, 1901 são parasitos de mamíferos, com caracteres incluindo testículos intercaecais, geralmente profundamente lobados ou ramificados, e extensos campos laterais de folículos vitelínicos. Os Schizamphistominae (sin. Megalodiscinae) são parasitos de anfíbios e répteis e, além de *Megalodiscus* e *Opisthodiscus* discutidos acima, carecem de uma ventosa acessória no acetábulo. Das subfamílias remanescentes, ambas com membros predominantemente parasitos de peixes de água doce, Kalitrematinae Travassos, 1934 caracteriza-se principalmente por possuir testículos caecais ou extracecais simétricos (utilizados em nível da subfamília por SEY, 1988, 1991; JONES, 2005b), ao passo que em Dadayiinae (sin. Dadaytrematinae Yamaguti, 1958) os testículos são intercaecais.

Goeldamphistomum difere de todos os outros gêneros classificados na família Cladorchiidae por possuir membros com uma ventosa acessória no acetábulo, um caráter não encontrado anteriormente em paranfistomoides parasitos de peixes. Como mencionado anteriormente, esse caráter tem sido usado em nível de gênero e de subfamília, sendo usado mais uma vez em nível de gênero no presente estudo.

Embora eles compartilhem esse importante caráter distintivo, os espécimes encontrados em *G. eques* e *T. trimaculatus* diferem dos encontrados em *D. peruanus*, *C. macropterus* e *Microglanis* sp. por outras características. *Goeldamphistomum amazonum* possui testículos diagonais, cujos níveis não se sobrepõem longitudinalmente e o poro

genital é pré-bifurcal no nível do bulbo esofágico, enquanto *G. peruanum* possui testículos obliquamente tandem, cujos níveis se sobrepõem longitudinalmente em linha média e o poro genital é pós-bifurcal.

Dois cladorquídeos foram reportados anteriormente no Peru segundo Luque et al., (2016), uma espécie não identificada de *Dadaytrema* e *Pseudocladorchis ferrumequinum* (Diesing, 1836). As espécies descritas neste estudo diferem de ambas pela presença da ventosa acessória no acetábulo, diferem de *Dadaytrema* sp. pela ausência dos testículos lobados e por ter campos de folículos vitelínicos mais extensos e de *P. ferrumequinum* na ausência de uma grande faringe com esfíncteres anterior e posterior, sacos intramurais e testículos simétricos.

Subfamily Dadayiinae Fukui, 1929

***Iquitostrema* Pantoja, Scholz, Luque & Jones, 2018**

Diagnose: Corpo de tamanho médio, cônico anteriormente, largura máxima no acetábulo. Acetábulo maciço, ventro-subterminal; superfície luminal coberta por grandes papilas. Papilas inconspícuas em forma de cúpula presentes ao redor da abertura oral e extremidade anterior. Abertura oral terminal. Faringe com sacos faríngeos extramurais. Esfíncter anterior da faringe presente. Esôfago longo. Bulbo esofágico presente, mas não fortemente muscular. Ambos com células de coloração densa. Cecos ligeiramente sinuosos estendem-se à margem anterior do acetábulo. Os dois testículos são mais ou menos simétricos, cecais, cada um cobrindo a região anterior do ceco adjacente; contorno irregular, aproximadamente oval alongado. Saco do cirro grande, posterodorsal ao poro genital, contendo vesícula seminal interna (parte proximal) e células prostáticas (parte distal); vesícula seminal externa presente. Ventosa genital ausente. Poro genital pré-bifurcal ao nível do bulbo esofágico. Ovário ovoide, mediano, próximo e anterior às extremidades cecais, anterior à margem anterior do acetábulo. Glândula de Mehlis dorsal ao ovário. Canal de Laurer e receptáculo seminal uterino não observados. O útero preenche o espaço intercecal e sobrepõe a parte posterior do ceco. Folículos vitelínicos em grande parte em dois campos restritos no nível e sobrepondo as extremidades dos cecos e a margem anterior do acetábulo; alguns invadem a linha média. Vesícula excretora e poros não observados. Parasitos do intestino de peixes doradídeos (*Hassar orestis*) (Siluriformes: Doradidae) da Amazônia peruana.

Espécie tipo (única espécie): *Iquitostrema papillatum* Pantoja, Scholz, Luque & Jones, 2018

Etimologia: O nome do gênero refere-se à localidade de coleta da espécie tipo.

Registro no Zoobank: 8834B4C2-76E4-43B0-9DC2-8737C5B25D70

Comentários:

O novo gênero é caracterizado pela combinação de um acetábulo maciço com papilas na superfície luminal e testículos simétricos que cobrem o ceco imediatamente posterior ao arco ceal. Enquanto eles ocorrem juntos ou separadamente em membros de algumas subfamílias de Cladorchiidae, alocação nestes é excluída pelo grupo de hospedeiros e/ou distribuição geográfica: Cladorchiinae Fischeoeder, 1901 contém táxons parasitos de mamíferos terrestres e aquáticos; Os Sandoniinae Ukoli, 1972 são parasitos

principalmente de peixes de água doce africanos e australianos (ocasionalmente peixes e tartarugas costeiras australianas). A morfologia dos presentes espécimes difere de todas as características dos gêneros nestas subfamílias e esta discussão, portanto, concentra-se em subfamílias com representantes em peixes dulcícolas, particularmente na América do Sul. O sistema de classificação seguido aqui é o de Jones (2005a, b).

Sey (1988) propôs a monotípica subfamília Colocladorchinae Sey, 1988 para *Colocladorchis ventrastomis* Thatcher, 1979 parasito de peixes prochilodontídeos no Brasil e na Colômbia. Essa espécie possui um acetábulo com papilas não tão largo como o corpo, testículos simétricos sobrepondo a parte anterior dos cecos e folículos vitelínicos em campos restritos, mas difere por possuir sacos faríngeos intramurais, cecos curtos terminando no meio do corpo, minúsculos grupos de folículos vitelínicos que se sobrepõem a região pósteromedial de cada ceco e um ovário intertesticular.

A subfamília Dadayiinae Fukui, 1929 possui muitos gêneros com espécies na América do Sul parasitando peixes dulcícolas, porém nenhum gênero possui a combinação dos caracteres acetábulo massivo e testículos simétricos. Os testículos são frequentemente tandem ou diagonal e intercecais; raramente a lateral dos testículos se sobrepõe aos cecos. Essas características impedem a inclusão da presente espécie nesta subfamília. Aqueles com testículos simétricos ou quase, mas intercecais são *Caballeroia* Thapar, 1960 de cyprinídeos na Índia, *Bancroftrema* Angel, 1966 de peixe pulmonado na Austrália e *Platycladorchis* Sey, 1986 de cyprinídeos no Vietnã. Os espécimes peruanos diferem das espécies desses gêneros em hospedeiros, distribuição geográfica e na estrutura do acetábulo.

Eles diferem ainda mais de *Caballeroia* spp. na posição mais anterior dos testículos, na presença de um bulbo esofágico e os folículos vitelínicos são restritos a pequenos grupos laterais próximos às extremidades cecais. Diferem de *Bancroftrema* spp. na posição do poro genital que é ligeiramente pré-bifurcal ao invés de pós-bifurcal, os cecos não são profundamente sinuosos, na posição mais anterior dos testículos e os folículos vitelínicos são em campos mais restritos. Sey (1986) descreveu duas novas espécies de *Platycladorchis*, ambas com corpos achatados semelhantes a folhas. Uma delas, *P. microacetabularis*, possui testículos simétricos, mas eles são intercecais e também tem o saco do cirro fortemente desenvolvido e um minúsculo acetábulo.

Este novo gênero é, portanto, colocado na subfamília Kalitrematinae que contém gêneros com espécies com testículos simétricos cecais ou extracecais (TRAVASSOS, 1934; JONES, 2005b). Trematódeos de quatro dos seus seis gêneros são parasitos de peixes dulcícolas na América do Sul, nomeadamente *Kalitrema* Travassos, 1933 de peixes loricarídeos, *Micramphistoma* Thatcher, 1992 de peixes hipopomídeos, *Betamphistoma* Thatcher & Jégu, 1996 em peixes caracídeos e *Pseudocladorchis* Daday, 1907 de serrasalmídeos, pimelodídeos e doradídeos. Todos os quatro foram relatados principalmente no Brasil. Os outros são *Brevicaecum* McClelland, 1957 em citharinídeos africanos e *Nicollo-discus* Srivastava, 1939 em silurídeos asiáticos.

Apenas com *Nicollo-discus* o novo gênero compartilha a presença de um acetábulo maciço com papilas e grande em relação ao tamanho corporal e testículos simétricos, mas os espécimes presentes diferem no tipo de corpo mais alongado, extremidade anterior menos acentuadamente cônica, ausência de uma ventosa genital (um caráter de importância genérica na superfamília) e testículos cecais ao invés de extracecais. Os folículos vitelínicos em *Nicollo-discus* spp. formam campos extracecais ao longo da parte posterior do ceco, confluentes formando medialmente em forma de U, mas estão em uma faixa aproximadamente horizontal em *Iquitostrema*. As papilas na

superfície luminal do acetábulo são espalhadas em *Nicoliodiscus* spp. mas densamente compactadas, cobrindo toda a superfície em *I. papillatum*.

A única espécie de *Micramphistoma*, *M. ministoma*, possui testículos simétricos que recobrem o arco cecal, mas os presentes espécimes diferem em que os cecos se estendem para o acetábulo ao invés de terminar bem longe dele, o ovário é mais ou menos entre as extremidades cecais ao invés de distante da terminação cecal e os folículos vitelínicos estão em campos restritos perto das extremidades cecais ao invés de em campos ao longo da metade posterior do ceco. Além disso, os sacos faríngeos e um bulbo esofágico estão ausentes em *Micramphistoma* (mas, pequenos sacos intramurais podem estar presentes) e o acetábulo nos presentes espécimes é muito maior e cheio de papilas.

A única espécie de *Betamphistoma* possui testículos simétricos cecais no meio do caminho ao longo do comprimento do ceco e não próximo ao arco cecal. Os cecos não alcançam o acetábulo, que é pequeno e não possui papilas, com um entalhe póstero-medial; o saco do cirro tem paredes musculares grossas.

Espécies de *Pseudocladorchis* possuem testículos em uma posição semelhante, mas o acetábulo não contém papilas e possuem um entalhe póstero-medial. Os presentes espécimes têm farínge com sacos extramurais ao invés de sacos intramurais, o ceco alcança o acetábulo e os folículos vitelínicos são restritos a dois campos perto das extremidades cecais.

Os cecos de *I. papillatum* se estendem até a margem do acetábulo enquanto que *Brevicaecum* possui cecos curtos que terminam, relativamente, após a uma curta distância além do ponto médio do comprimento do corpo. Além disso, *Brevicaecum* não possui saco do cirro e o acetábulo é pequeno e sem papilas.

Iquitostrema pode ser distinguido de *Kalitrema* por não possuir um anel circular ao redor da região anterior do corpo e um entalhe mediano profundo na extremidade posterior. Além disso, os testículos não são extracecais e anteriores ao arco cecal. Os cecos se sobrepõem à borda anterior do acetábulo ao invés de terminar próximo a ele e os folículos vitelínicos estão em grupos próximos às extremidades cecais ao invés de em campos alongados a partir da metade posterior dos cecos. O acetábulo é maciço com a superfície luminal com papilas.

***Iquitostrema papillatum* Pantoja, Scholz, Luque & Jones, 2018**

Figura 3. A-C

Hospedeiro tipo: *Hassar orestis* (Steindachner) (Siluriformes: Doradidae) (host code PI 46b).

Localidade tipo: Rio Amazonas, Iquitos, Província de Maynas, Região de Loreto, Peru (03° 45' 60"S, 73° 14' 44"O).

Sítio de infecção: intestino.

Parâmetros de infecção: Um peixe examinado e infectado com três digenéticos.

Material tipo: Holótipo (IPCAS D-771/1), 1 parátipo (NHMUK 2018.6.14.4).

Registro no ZooBank: A8702666-D3BA-4042-897A-DEBF 46F637DA.

Etimologia: O nome específico refere-se à presença de numerosas papilas na superfície luminal do acetábulo.

Descrição baseada em dois espécimes montados na mesma lâmina.

Dois grandes espécimes completamente maduros (ambos levemente danificados, cada um com 2 pequenas divisões na periferia do acetábulo). Comprimento corporal 5,94–7,03; largura máxima no acetábulo. Acetábulo ventro-subterminal, massivo em relação ao tamanho do corpo, mais largo que o corpo 2,56–2,82 de comprimento, 2,78–2,89 de largura; superfície luminal coberta por grandes papilas. Papilas quase imperceptíveis presentes em torno da abertura oral e da extremidade anterior, estendendo-se ao nível das extremidades dos sacos faríngeos. Abertura oral terminal. Comprimento da faringe 520-583, 620-668 de largura; esfíncter faríngeo anterior presente. Sacos extramurais primários proeminentes presentes, direito 362-365 e esquerdo 323-381 de comprimento. Esôfago longo, 1,02 (ambos os espécimes). Bulbo esofágico presente, bem, mas não fortemente desenvolvido, 254-309 de comprimento. Esôfago e bulbo ambos revestidos de células de coloração densa. Distância da bifurcação cecal à extremidade anterior 1,43-1,6 mm (23% do comprimento do corpo). Os cecos se estendem e podem sobrepor ao nível da margem anterior do acetábulo, ligeiramente sinuosos.

Os dois testículos são irregulares em contorno, ligeiramente recuados, aproximadamente oval-alongado, mais ou menos simétricos, cada um sobrepondo a região anterior do ceco adjacente; direito 831–1000 de comprimento e 477–543 de largura; esquerdo 827–1.020 de comprimento e 528–631 de largura. Saco do cirro grande, póstero-dorsal para poro genital, contém vesícula seminal interna (parte proximal) e células prostáticas (parte distal); vesícula seminal externa póstero-lateral a ela. Ventosa genital verdadeira ausente. Poro genital pré-bifurcal no nível do bulbo esofágico (pode estar deslocado da posição mediana); cercado por uma elevada prega genital contendo células de coloração densa.

Ovário ovoide, mediano, próximo e anterior à terminação cecal e anterior à margem anterior do acetábulo, 238 de comprimento por 274–347 de largura. Glândula de Mehlis dorsal ao ovário, um pouco maior em extensão. Canal de Laurer e receptáculo seminal uterino não observados. Útero cheio de ovos preenche o espaço intercecal, sobrepõe-se a parte posterior do ceco. Ovos colapsados, quase nenhum mensurável, órgãos femininos proximais e obscuros. Folículos vitelínicos em grande parte em dois campos restritos ao nível e sobreposição de extremidades cecais e margem anterior acetábulo; poucos folículos invadem a linha média. Vesícula excretora e poros não observados.

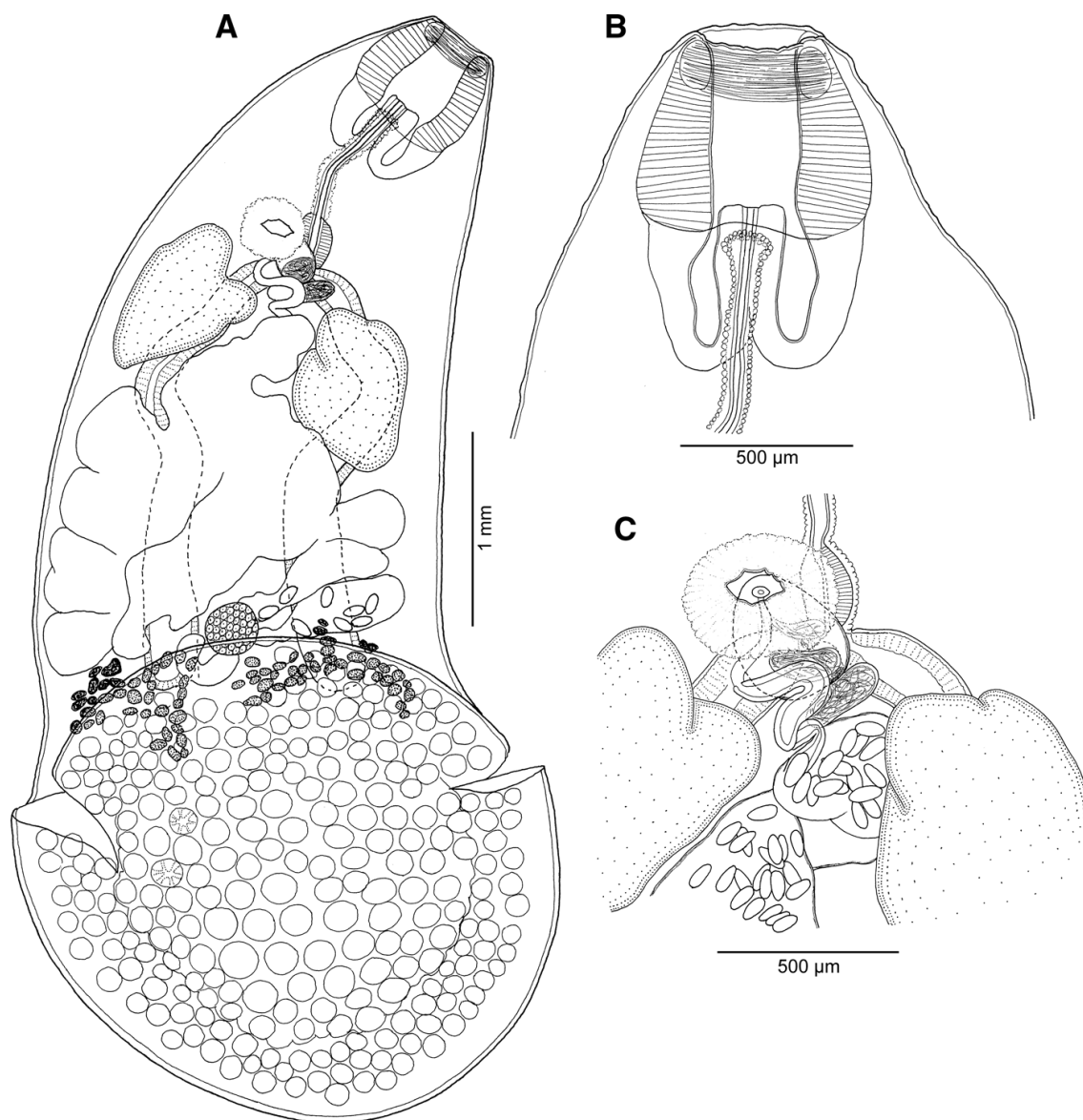


Figura 3. *Iquitostrema papillatum* coletado em *Hassar orestis*. **A**, holótipo, vista ventral (observa-se o acetábulo com papilas na superfície luminal). **B**, faringe, vista ventral (parátipo); **C**, ductos terminais, vista ventral (holótipo).

4. Discussão

O Peru tem uma das mais extensas faunas de peixes, porém esta fauna foi pouco estudada para o conhecimento da diversidade de parasitos em relação a outras regiões geográficas. Muito mais esforços são necessários para compreender sua verdadeira diversidade parasitária e fornecer um guia para mais estudos. Até hoje, trematódeos de peixes dulcícolas e outros grupos de parasitos têm sido pouco explorados. Atualmente, 28 espécies de digenéticos em peixes dulcícolas foram relatadas no país (CHOUDHURY et al., 2016; LUQUE et al., 2016b). No presente contexto, três espécies em dois novos gêneros de cladorquídeos foram descritas a partir de Siluriformes da Amazônia peruana,

umentando assim o número de espécies desses paranfistomoides de peixes neotropicais para 35 espécies em 24 gêneros, em comparação com os registros de Choudhury et al. (2016).

O presente estudo aumenta o número de cladorquídeos de peixes no Peru pelo acréscimo de três novas espécies em dois novos gêneros (um monotípico) e isso simplesmente enfatiza a fato de que, até o momento, os cladorquídeos não foram estudados com detalhes na bacia amazônica peruana, onde apenas duas espécies foram previamente reportadas. A maioria dos gêneros relatados em peixes da América do Sul é monotípica (THATCHER, 2006) porque as características morfológicas de suas espécies tipo são muito distintas. Isto também se aplica aos dois gêneros propostos no presente estudo, que possuem algumas características significativas, como a presença de uma ventosa acessória no acetábulo, presença de um acetábulo maciço com papilas na superfície luminal e testículos simétricos que cobrem o ceco perto do arco cecal. No entanto, futuros estudos moleculares podem revelar se o conceito atual de gêneros monotípicos ou pobres em espécies de cladorquídeos corresponde às inter-relações destes parasitos.

Cladorquídeos foram relatados em cinco ordens de peixes na América do Sul (Characiformes, Gymnotiformes, Perciformes, Salmoniformes e Siluriformes), e em peixes onívoros, carnívoros e herbívoros (THATCHER, 2006; LOPES et al., 2011; FROESE; PAULY, 2018). A maioria desses parasitos ocorre em Characiformes, onde 23 espécies de 17 gêneros já foram relatadas neste grupo de hospedeiros. Somente 13 espécies de 10 gêneros foram relatadas em peixes Siluriformes, incluindo as novas espécies descritas neste estudo. Este é o primeiro registro de um cladorquídeo em Pseudopimelodidae. Entre os Siluriformes, os doradídeos são os principais hospedeiros de cladorquídeos (THATCHER, 2006). Siluriformes têm sido pouco estudados, embora eles sejam muito comuns na bacia do rio Amazonas.

5. Referências Bibliográficas

ALBERT, J. S.; REIS, R. E. Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes. Berkeley, CA: **University of California Press**, 338p, 2011.

CHOUDHURY, A.; AGUIRRE-MACEDO, M. L.; CURRAN, S. S.; OSTROWSKI DE NUÑEZ, M., OVERSTREET, R. M.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; et al. Trematode diversity in freshwater fishes of the Globe II: 'New World'. **Systematic Parasitology**, v 93. n. 3, p. 271–282, 2016.

FROESE, R.; PAULY, D. (Eds). FishBase. **World Wide Web electronic publication**. Disponível em: www.fishbase.org, versão 10/2018.

ICZN. International Commission on Zoological Nomenclature: Amendment of articles 8, 9, 10, 21 and 78 of the International Code of Zoological Nomenclature to expand and refine methods of publication. **Bulletin of Zoological Nomenclature**, v. 219 n. 69, p. 161–169, 2012.

JONES, A. Superfamily Paramphistomoidea Fiscoeder, 1901. In: Jones, A., Bray, R. A. & Gibson, D. I. (Eds). Keys to the Trematoda. Volume 2. Wallingford, UK: **CAB International & The Natural History Museum**, p. 221–227, 2005a.

JONES, A. Family Cladorchiidae Fiscoeder, 1901. In: Jones, A., Bray, R. A. & Gibson, D. I. (Eds). Keys to the Trematoda. Wallingford, UK: **CAB International & The Natural History Museum**, v. 2, p. 257–317, 2005b.

JONES, A. Family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901. In: Jones, A., Bray, R. & Gibson, D. I. (Eds). Keys to the Trematoda. Wallingford, UK: **CAB International & The Natural History Museum**, v.2, p. 229–246, 2005c.

JONES, A. Family Balanorchiidae Stunkard, 1925. In: Jones, A., Bray, R. & Gibson, D. I. (Eds). Keys to the Trematoda. Wallingford, UK: **CAB International & The Natural History Museum**, v. 2, p. 247–252, 2005d.

JONES, A. Family Brumptiidae Stunkard, 1925. In: Jones, A., Bray, R. & Gibson, D. I. (Eds). Keys to the Trematoda. Wallingford, UK: **CAB International & The Natural History Museum**, v. 2, p. 251–252, 2005e.

JONES, A. Family Choerocotyloididae Yamaguti, 1971. In: Jones, A., Bray, R. & Gibson, D. I. (Eds). Keys to the Trematoda. Wallingford, UK: **CAB International & The Natural History Museum**, v. 2, p. 253–255, 2005f.

JONES, A. Family Diplodiscidae Cohn, 1904. In: Jones, A., Bray, R. & Gibson, D. I. (Eds). Keys to the Trematoda. Wallingford, UK: **CAB International & The Natural History Museum**, v.2, p. 319–324, 2005g.

JONES, A. Family Gastrodiscidae Monticelli, 1892. In: Jones, A., Bray, R. & Gibson, D. I. (Eds). Keys to the Trematoda. Wallingford, UK: **CAB International & The Natural History Museum**, v. 2, p. 325–336, 2005h.

JONES, A. Family Gastrothylacidae Stiles &Goldberger, 1910. In: Jones, A., Bray, R. & Gibson, D. I. (Eds). Keys to the Trematoda. Wallingford, UK: **CAB International & The Natural History Museum**, v. 2, p. 337–341, 2005i.

JONES, A. Family Olveriidae Yamaguti, 1958. In: Jones, A., Bray, R. & Gibson, D. I. (Eds). Keys to the Trematoda. Wallingford, UK: **CAB International & The Natural History Museum**, v. 2, p. 343–345, 2005j.

JONES, A. Family Stephanopharyngidae Stiles & Goldberger, 1910. In: Jones, A., Bray, R. & Gibson, D. I. (Eds). Keys to the Trematoda. Wallingford, UK: **CAB International & The Natural History Museum**, v. 2, p. 347–348, 2005k.

JONES, A. Family Zonocotylidae Yamaguti, 1963. In: Jones, A., Bray, R. & Gibson, D. I. (Eds). Keys to the Trematoda. Wallingford, UK: **CAB International & The Natural History Museum**, v. 2, p. 349–351, 2005l.

JONES, A. (2005m). Family Zygocotylidae Ward, 1917. In: Jones, A., Bray, R. & Gibson, D. I. (Eds). Keys to the Trematoda. Volume 2. Wallingford, UK: **CAB International & The Natural History Museum**, v.2, p. 353–356, 2005m.

KASSAI, T. Veterinary Helminthology. **Oxford: Butterworth & Heinemann**, 260 pp, 1999.

LACERDA, A. C. F.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. A new species of *Dadayius* Fukui, 1929 (Digenea: Cladorchiidae), parasite of the intestinal tract of *Metynnis maculatus* (Kner, 1858) (Characidae) from the upper Parana´ River floodplain. Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 283–285, 2003.

LOPES, L. P. C.; KARLING, L. C.; TAKEMOTO, R. M.; ROSSONI, F.; FERREIRA, E. J. G.; PAVANELLI, G. C. A new species of *Dadayius* Fukui, 1929 (Digenea: Cladorchiidae), parasite of *Symphysodon aequifasciatus* Pellegrin, 1904 (Perciformes: Cichlidae) from the Purus River, **Amazon, Brazil. Helminthologia**, v. 48, n. 3, p. 200–202, 2011.

LUQUE, J. L.; CRUCES, C.; CHERO, J.; PASCHOAL, F.; ALVES, P. V.; DA SILVA, A. C.; SÁNCHEZ, L.; IANNACONE, J. Checklist of metazoan parasites of fishes from Peru. **Neotropical Helminthology**, v. 10, n. 2, p. 301–375, 2016.

LUQUE, J. L.; PEREIRA, F. B.; ALVES, P. V.; OLIVA, M. E.; TIMI, J. T. Helminth parasites of South American fishes: current status and characterization as a model for studies of biodiversity. **Journal of Helminthology**, v. 91, n. 2, p. 150–164, 2016.

MUNIZ-PEREIRA, L. C.; VIEIRA, F. M.; LUQUE, J. L. Checklist of helminth parasites of threatened vertebrate species from Brazil. **Zootaxa**, v. 2123, p. 1–45, 2009.

NÄSMARK, K. E. A revision of the trematode family Paramphistomidae. **Zoologiska Bidrag fran Uppsala**, v. 16, p. 301–565, 1937.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M.; ARREDONDO, N. J.; GIL DE PERTIERRA, A. A. Adult trematodes (Platyhelminthes) of freshwater fishes from Argentina: A checklist. **Revue Suisse de Zoologie**, v. 124, n. 1, p. 91–113, 2017.

SEY, O. Reconstruction of the systematics of the family Diplodiscidae Skrjabin, 1949 (Trematoda: Paramphistomata). **Parasitologia Hungarica**, v. 16, p. 63–89, 1983.

SEY, O. Description of some new taxa of amphistomes (Trematoda, Amphistomida) from Vietnamese freshwater fishes. **Acta Zoologica Hungarica**, v. 32, p. 161–168, 1986.

SEY, O. Scope of and proposal for systematics of the Amphistomida (Lu'he, 1909) Odening, 1974. **Parasitologia Hungarica**, v. 21, p. 17–30, 1998.

SEY, O. CRC Handbook of the zoology of amphistomes. **Boca Raton**: CRC Press, 480 p, 1991.

THATCHER, V. E. Two unusual new genera of Paramphistomidae (Trematoda, Digenea) from freshwater fish of the Brazilian Amazon. **Acta Amazonica**, v. 22 (1992), n. 4, p. 609–613, 1993.

THATCHER, V. E. Amazon fish parasites (second edition), Aquatic biodiversity in Latin America. Volume 1. Sofia & Moscow: Pensoft, 508 pp. Travassos, L. (1934). Synopse dos Paramphistomoidea. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 29, p. 19–178, 2006.

Capítulo II

Primeiro estudo filogenético molecular de digenéticos cladorquídeos (Digenea: Paramphistomoidea) parasitos de peixes neotropicais, incluindo descrições de três novas espécies e novos registros geográficos e de hospedeiros

Resumo

A primeira análise molecular das relações filogenéticas de trematódeos cladorquídeos (Paramphistomoidea) de peixes dulcícolas baseados em sequências 28S rDNA, ITS2 rDNA e *cox1* mtDNA revelou as subfamílias Dadayiinae e Kalitrematinae como não-monofiléticas, enquanto que o gênero *Dadaytrema* representado por três espécies é monofilético. Uma lista de 15 espécies de cladorquídeos encontrados em peixes Characiformes, Perciformes e Siluriformes na Região Neotropical (Brasil e Peru) é dotada de inúmeros novos registros geográficos e de hospedeiros, e primeiras fotos de MEV de sete espécies. Duas novas espécies de Dadayiinae e uma nova espécie de Kalitrematinae são descritas. *Microrchis* sp. de *Pimelodella cristata*, *Tetranematichthys quadrifilis* e *Pterodoras granulosus* no Brasil e Peru difere de todos os três congêneres em que os testículos são diretamente tandem, não oblíquos e o ovário, situado entre as extremidades cecais, é amplamente separado dos testículos. *Pronamphistoma* sp. de *Heros* sp. no Brasil pode ser distinguida do tipo e única espécie conhecida, *P. cichlasomae* Thatcher, 1992, pela ausência da expansão anterior em forma de colar (presente na espécie-tipo), a presença de sacos faríngeos extramurais ao invés de intramurais e no desenvolvimento incomum da série de fibras musculares circulares externas dorsais e ventrais no acetábulo. *Pseudocladorchis* sp. de *Pterodoras granulosus*, *Brachyplatystoma vaillantii*, *Calophysus macropterus*, *Megalodoras uranoscopus* e *Oxydoras niger* no Brasil e Peru, é mais semelhante a *P. nephrodorchis*, mas difere na forma de testículos (de forma irregular versus reniforme na última espécie) e tamanho do ovário (tão grande quanto ou maior que os testículos na nova espécie). O diagnóstico genérico de *Pronamphistoma* Thatcher, 1992 foi emendado.

Palavras-chave: Trematoda, novas espécies, MEV, 28S rDNA

Abstract

First molecular assessment of phylogenetic relationships of cladorchiid trematodes (Paramphistomoidea) from freshwater fishes based on 28S rDNA, ITS2 and *cox1* sequences reveals the subfamilies Dadayiinae and Kalitrematinae as non-monophyletic, whereas *Dadaytrema* represented by three species is monophyletic. An annotated list of 15 species of cladorchiids found by the present authors in characiform, perciform and siluriform fishes in the Neotropical Region (Brazil and Peru) is provided with numerous new host and geographical records, and first scanning electron micrographs of seven species. Two new species of dadayine and one new species of kalitrematine trematodes are described. *Microrchis* sp. from *Pimelodella cristata*, *Tetranematichthys quadrifilis* and *Pterodoras granulosus* in Brazil and Peru differs from all three congeners in that the testes are directly tandem, not oblique, and that the ovary, situated between the caecal ends, is widely separated from the testes. *Pronamphistoma* sp. from *Heros* sp. in Brazil can be distinguished from the type and only known species, *P. cichlasomae* Thatcher, 1992, by the absence of the anterior collar-like expansion (present in the type species), the presence of extramural rather than intramural pharyngeal sacs, and the unusual development of the dorsal and ventral exterior circular muscle fibre series in the acetabulum. *Pseudocladorchis* sp. from *Pterodoras granulosus*, *Brachyplatystoma vaillantii*, *Calophysus macropterus*, *Megalodoras uranoscopus* and *Oxydoras niger* in Brazil and Peru, is most similar to *P. nephrodorchis* but differs in the shape of testes (irregular in shape versus reniform in the latter species) and size of the ovary (as large as, or larger than, the testes in the new species). Generic diagnosis of *Pronamphistoma* Thatcher, 1992 was amended.

Keywords: Trematoda, new species, SEM, 28S rDNA

1. Introdução

Paramphistomoidea Fiscoeder, 1901 é uma superfamília de digenéticos de distribuição cosmopolita caracterizados pela ausência da ventosa oral e pela posição posterior do largo acetábulo. Eles constituem um dos mais importantes grupos de helmintos parasitos de ruminantes que possuem um amplo espectro de hospedeiros definitivos, juntamente com uma ampla distribuição geográfica (SEY, 2005).

Esses digenéticos estão classificados em 12 famílias e são encontrados em todos os grupos de vertebrados, sendo mais comum em peixes de água doce e salobra (JONES, 2005a). Várias espécies de diferentes famílias de Paramphistomoidea tem importância veterinária, especialmente membros de Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 e Gastrothylacidae Stiles & Goldberger, 1910, que são causadores da paranfistomíase, uma doença coletiva entre os ruminantes (SANABRIA; ROMERO 2008).

Na América do Sul, espécies de Cladorchiidae Fiscoeder, 1901, Diplodiscidae Cohn, 1904 e Zonocotylidae Yamagute, 1903 são parasitos de peixes de água doce, sendo que os cladorquídeos são o segundo grupo com maior riqueza de espécies de trematódeos parasitos peixes continentais (THATCHER 2006). A maioria das espécies foi descrita na bacia do Rio Amazonas, especialmente no Brasil (THATCHER, 2006). Até então, 35 espécies de cladorquídeos foram descritas em 24 gêneros parasitando peixes dulcícolas na América do Sul (CHOUDHURY et al. 2016; PANTOJA et al. 2018), mas a validade de algumas espécies devem ser confirmadas, devido a descrições insuficientes e/ou baseadas em material de baixa qualidade, frequentemente, espécimes fortemente achatados, contraídos ou decompostos. A maioria dos estudos sobre cladorquídeos tem sido limitada a descrições morfológicas sem o uso de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para documentar detalhes da superfície corpórea. Estudos moleculares e filogenéticos são escassos e quase exclusivamente limitados aos táxons de importância veterinária, por exemplo, espécies de Paramphistomidae (LAIDEMITT et al. 2010; LOTFY et al. 2010; SOKOLOV et al. 2016; VÉLEZ et al. 2018). Em contraste, não há dados moleculares de cladorquídeos parasitos de peixes da Região Neotropical para analisar suas inter-relações. O monofiletismo das subfamílias de cladorquídeos, até então, não havia sido testado usando abordagens moleculares.

Durante um estudo de helmintos parasitos de peixes dulcícolas no Brasil e no Peru entre 2004 e 2018, foi coletado um extenso material de trematódeos cladorquídeos. Além de três novas espécies de dois novos gêneros que foram recentemente descritas por Pantoja et al., (2018) da Amazônia peruana, o novo material contém outras três novas espécies que são descritas neste capítulo e numerosos novos registros geográficos e de hospedeiros. Além disso, o novo material nos permitiu fazer a primeira tentativa de avaliar as relações filogenéticas dentre os membros desta família usando três marcadores moleculares diferentes. Micrografias eletrônicas de varredura de vários táxons também são fornecidas pela primeira vez para documentar detalhes desses trematódeos de morfologia peculiar.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta de Material

Os peixes foram coletados por pescadores locais ou comprados nos mercados de peixe em Belém, Iquitos, Região de Loreto, Peru, em 2004 - 2006, 2008, 2009, 2011 e 2018, e de várias localidades no Brasil (Amapá, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraná, Rondônia e Tocantins, nas Bacias do Amazonas, Atlântico Nordeste Ocidental e Paraná) entre 2013-2017. Eles foram examinados com o auxílio de microscópio estereoscópio para coleta dos parasitos. Os parasitos coletados foram lavados em solução salina e fixados em formalina aquecida (4%) ou em etanol absoluto para estudos moleculares. Os espécimes fixados em formalina aquecida foram transferidos para etanol 70% para posteriores estudos morfológicos. Nomenclatura e classificação dos hospedeiros foram feitas seguindo Froese & Pauly (2018).

2.2. Análise morfológica

Os espécimes fixados em formalina aquecida foram corados com Carmalúmem de Mayer e foram desidratados em uma série ascendente de concentrações etílicas. Posteriormente, foram clarificados com eugenol (óleo de cravo) e montados em bálsamo do Canadá em lâminas permanentes.

Os desenhos foram feitos usando um tubo acoplado no microscópio BX51 Olympus. As medidas foram feitas usando o software cellSens Dimension adaptado ao microscópio Olympus SZX16 e foram dadas em micrômetros, exceto quando indicado de outra forma; dados métricos foram dados com o intervalo seguido pela média entre parênteses.

Os espécimes para observações de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram preparados usando a metodologia proposta por Kuchta e Caira (2010) e examinadas com um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo JEOL JSM-7401F (JEOL Ltd., Tóquio, Japão) no Instituto de Parasitologia da República Tcheca.

Para comparação, tipos e vouchers de cladorquídeos depositados na coleção do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA), Manaus, Brasil, foram estudados (Ver lista dos espécimes estudados em Pantoja et al., 2018). Alguns tipos e vouchers de espécimes de cladorquídeos coletados por J. Natterer na Amazônia brasileira, posteriormente descritos por K. M. Diesing e depositados no Museu de História Natural de Viena (Zoologisches Museum Wien –ZWM) também foram estudados.

Holótipos e parátipos dos novos táxons propostos aqui serão depositados futuramente na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro (CHIOC), Brasil, considerando que outros parátipos serão depositados na Coleção do Centro de Biologia da Academia de Ciências da República Tcheca (IPCAS), Museu de História Natural, Genebra, Suíça (MHNG-PLAT) e Museu de História Natural em Londres, Reino Unido (NHMUK).

2.3. Análise molecular

2.3.1. Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

O DNA total foi isolado de cada espécime individualmente fixado em etanol absoluto. Cada amostra foi colocada em 200 microlitros de Chelex® contendo 0,1 mg/ml de proteinase K (Promega), seguido de incubação de 56°C por 3 horas, aquecimento em

90°C por 8 minutos e centrifugação a 14.000rpm por 10 minutos (ver Tabela 1 para uma lista de amostras sequenciadas).

A região intergênica ITS2 do DNA ribossomal foi amplificada usando os primers GA1 [5-AGA ACA TCG ACA TCT TGA AC-3] (ANDERSON; BARKER 1998) e BD2 [5-TAT GCT TAA ATT CAG CGG GT3] (LUTON et al. 1992). O volume final da reação de PCR foi de 25 µl, sendo 2,5 µl de tampão de reação menos Mg (10X), 1,5 µl de MgCl₂ (50mM), 2 µl de dNTP's (2,5mM), 1.5 µl de cada primer (10mM), 0.2 de 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 ao parâmetro de amplificação proposto por Lofty et al. (2010).

A região 28S do DNA ribossomal foi amplificada usando os primers digl2 (5-AAG CAT ATC ACT AAG CGG-3) e L0 [5-GCT ATC CTG AG (AG) GAA ACT TCG-3] (TKACH et al. 2000). As concentrações da reação de PCR foram as mesmas utilizadas para ITS2. As amostras foram colocadas no termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf) e submetidas ao parâmetro de amplificação proposto por Tkach et al. (2000).

A região codificante da subunidade I da citocromo oxidase (*cox-1* mtDNA) foi amplificada usando os primers JB3 [5-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3] e JB4 [5-TAAAGAAAGAACATAAGTAAAATG-3] (BOWLES et al., 1992). O volume final da reação de PCR foi de 25 µl, sendo 2,5 µl de tampão de reação menos Mg (10X), 1,5 µl of MgCl₂ (50 mM), 1, 5 µl of dNTP's (2.5 mM), 1.5 µl de cada primer (10 mM), 0.25 µl de Platinum Taq DNA polymerase (5 U/µl), 14.25 µl de H₂O e 2 µl de DNA genômico. As amostras foram colocadas no termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf) e submetidas ao parâmetro de amplificação proposto por UTUK e PISKIN (2012).

O produto da PCR foi visualizado com Sybergreen (Invitrogen, Eugene, EUA) 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, UK) seguindo as instruções do fabricante.

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), 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). Os contíguos das sequências foram alinhados por correspondência nucleotídica e as regiões complementares aos iniciadores foram excluídas.

2.3.2. Análise filogenética

As sequências obtidas neste estudo e as obtidas no GenBank foram alinhadas usando o algoritmo E-INS-I do programa MAFFT (KATO; STANDLEY 2013) implementado no GeneiousTM versão 8.1.4. Os alinhamentos foram analisados pelos métodos de Inferência Bayesiana (BI) e Máxima Verossimilhança (ML) empregando o modelo de substituição de nucleotídeos que foi calculado no programa jModelTest v2.1.10 (DARRIBA et al., 2012). Para a análise 28S rDNA, o modelo de substituição de

nucleotídeos foi GTR + I + G. Na análise do *cox1* mtDNA, o modelo de substituição de nucleotídeos foi GTR + G e para a análise de ITS2, o modelo de substituição de nucleotídeos foi K80 + G. A melhor estimativa de ML foi obtida a partir de 100 buscas no programa GARLI ver. 2.01 (ZWICKL, 2006) usando configurações padrão. O suporte nodal foi avaliado executando pesquisas em árvore em cada uma das 100 réplicas de bootstrap no GARLI. Árvore de BI foi construída usando MrBayes ver. 3.2 (RONQUIST et al. 2012) executando dois MC3 independentes de 4 cadeias (uma fria, três aquecida) por 5 milhões de gerações (ngen = 5.000.000), topologias de árvore de amostragem a cada 1.000ª geração (samplefreq = 1.000) e as primeiras 500 amostras foram descartados como burn-in (burninfrac = 0,10). Tracer v.1.6 (RAMBAUT et al. 2014) foi usado para verificar a convergência e a mistura de diferentes parâmetros e para confirmar que o tamanho efetivo da amostra (ESS) de cada parâmetro era adequado para fornecer estimativas razoáveis da variância nos parâmetros do modelo (ie Valores de ESS > 200).

O diplodiscídeo *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) (AY222212) foi usado como grupo externo para análise de 28S rDNA. Sequências do cladorquídeo *Amurotrema dombrowskajae* Achmerow, 1959 (KT321869) obtida no GenBank e sequências geradas neste trabalho dos cladorquídeos *Helostomatis* cf. *helostomatis* MacCallum, 1905 da Tailândia e *Pisciamphistoma stunkardi* (Holl, 1929) dos EUA foram analisadas. *Diplodiscus mehrai* Pande, 1937 (GU735639) foi usado como grupo externo para a análise de ITS2 rDNA. Árvore filogenética para os dados de *cox1* mtDNA foi gerada sem grupo externo.

Tabela 1. Lista de paranfistomoides cujas sequências foram utilizadas para análises e sequências de cladorquídeos obtidas no presente estudo coletados no Brasil e no Peru.

Espécie	Família	Hospedeiro	28S rDNA	ITS2 rDNA	cox1 mtDNA	País	Coleção
<i>Amurotrema dombrowskajae</i>	Cladorchiidae	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	KT321869			Russia	
Cladorchiidae gen. sp.	Cladorchiidae	<i>Metynnis lippincottianus</i>				Brasil	PAIA06f
Cladorchiidae gen. sp.	Cladorchiidae	<i>Tetranematichthys quadrifilis</i>				Brasil	PAIA01a
<i>Dadaytrema gracile</i>	Cladorchiidae	<i>Pimelodella gracilis</i>				Brasil	BRMS99a
<i>Dadaytrema gracile</i>	Cladorchiidae	<i>Pimelodella megalura</i>				Brasil	BRMS04a
<i>Dadaytrema gracile</i>	Cladorchiidae	<i>Pimelodus blochii</i>				Brasil	BRRO61a
<i>Dadaytrema gracile</i>	Cladorchiidae	<i>Pimelodus fur</i>				Brasil	BRMS42b
<i>Dadaytrema minimum</i>	Cladorchiidae	<i>Pimelodus</i> sp.				Brasil	BRT023c
<i>Dadaytrema minimum</i>	Cladorchiidae	<i>Pterodoras granulosus</i>				Peru	PI44a
<i>Dadaytrema minimum</i>	Cladorchiidae	<i>Tocantinsia piresi</i>				Brasil	BRX58a
<i>Dadaytrema oxycephalum</i>	Cladorchiidae	<i>Pterodoras granulosus</i>				Brasil	BRPR77b
<i>Dadaytrema oxycephalum</i>	Cladorchiidae	<i>Pterodoras granulosus</i>				Brasil	BRMS45b
<i>Dadaytrema oxycephalum</i>	Cladorchiidae	<i>Pygocentrus nattereri</i>				Brasil	BRMS54a
<i>Doradamphistoma parauchenipteri</i> n. comb	Cladorchiidae	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>				Brasil	AMP59a
<i>Doradamphistoma parauchenipteri</i> comb. nov.	Cladorchiidae	<i>Trachelyopterus galeatus</i>				Brasil	BRPR84c
<i>Doradamphistoma parauchenipteri</i> comb. nov.	Cladorchiidae	<i>Trachelyopterus galeatus</i>				Peru	PI803a
<i>Doradamphistoma bacuensis</i>	Cladorchiidae	<i>Megalodoras uranoscopus</i>				Brasil	PAX76a
<i>Doradamphistoma bacuensis</i>	Cladorchiidae	<i>Megalodoras uranoscopus</i>				Peru	PI324b

<i>Doradamphistoma bacuensis</i>	Cladorchiidae	<i>Platydoras costatus</i>		Peru	PI353a
<i>Goeldamphistomum peruanum</i>	Cladorchiidae	<i>Duopalatinus peruanum</i>		Peru	PI403a
<i>Helostomatis cf. helostomatis</i>	Cladorchiidae	<i>Labiobarbus siamensis</i>		Tailândia	TH3
<i>Iquitostrema papillatum</i>	Cladorchiidae	<i>Hassar orestis</i>		Peru	PI46b
<i>Pseudocladorchis nephrodorchis</i>	Cladorchiidae	<i>Myloplus rubripinnis</i>		Brasil	PAX44a
<i>Pseudocladorchis nephrodorchis</i>	Cladorchiidae	<i>Serrasalmus manuelli</i>		Brasil	PAX61c
<i>Pseudocladorchis nephrodorchis</i>	Cladorchiidae	<i>Tometes kramponhah</i>		Brasil	PAX42b
<i>Pseudocladorchis</i> sp.	Cladorchiidae	<i>Oxydoras niger</i>		Peru	PEOX03
<i>Pseudocladorchis</i> sp.	Cladorchiidae	<i>Pterodoras granulatus</i>		Peru	PI829a
<i>Diplodiscus subclavatus</i>	Diplodiscidae	<i>Rana ridibunda</i>	AY222212	Bulgária	
<i>Calicophoron microbothrium</i>	Paramphistomidae	<i>Bulinus forskalii</i>	GU735639	Tanzânia	

3. Resultados

A análise morfológica de numerosos espécimes de trematódeos cladorquídeos encontrados em peixes dulcícolas no Brasil e no Peru coletados entre 2004 e 2018 revelou a presença de 15 espécies, não considerando três novas espécies descritas recentemente por Pantoja et al. (2018). Destas 15 espécies, três são novas para a ciência e são descritas no presente capítulo. Uma lista de cladorquídeos previamente conhecidos está disponível e fotos de microscopia eletrônica de varredura foram fornecidas para sete espécies.

Além disso, sequências de 28S rDNA de 27 isolados de 12 espécies (duas não identificadas ao nível genérico ou espécie), sequências de ITS2 rDNA de 12 isolados de 5 espécies e sequências de *cox1* mtDNA de 28 isolados de 10 espécies (três não identificados até o nível genérico ou nível de espécie). Um total de 1.073, 365 e 396 bases nucleotídicas foi observado após o alinhamento completo de 28S rDNA, ITS2 rDNA e *cox1* mtDNA, respectivamente.

Cladorquídeos encontrados em peixes dulcícolas do Brasil e do Peru (espécies e subfamílias estão listadas alfabeticamente, com os novos táxons listados primeiros. Novos registros de hospedeiros são indicados por um asterisco).

Superfamília Paramphistomoidea Fiscoeder, 1901

Família Cladorchiidae Fiscoeder, 1901

Subfamília Dadayiinae Fukui, 1929

***Microrchis* sp.**

Figura 1. A

Descrição baseada em cinco espécimes – medidas de espécimes a partir de hospedeiros diferentes estão na tabela 1.

Corpo alongado, com largura máxima no meio do corpo. Acetábulo com entalhe pósteromedial. Extremidade anterior afilada. Papilas tegumentares em torno da abertura oral, estendendo-se ao nível da faringe. Faringe com apenas esfíncter anterior e sacos intramurais primários pareados. Esôfago sinuoso, com fibras musculares moderadamente desenvolvidas por toda parte. Bulbo esofágico alongado delgado presente, muitas vezes lateralmente inclinado. Cecos ligeiramente sinuosos; suas extremidades não se aproximam do acetábulo. Testículos intercecais, diretamente tandem, não contíguos, subesféricos a transversalmente ovais. Saco do cirro imediatamente pós-bifurcal, oval, contém vesícula seminal interna e células prostáticas (parte distal). Poro genital imediatamente pós-bifurcal, rodeado por tecido glandular. Ovário entre as extremidades cecais, ovoide, geralmente maior que os testículos. Canal de Laurer não observado. Folículos vitelínicos em campos laterais do nível do testículo posterior ao do ovário. O útero de espécimes pequenos forma uma alça descendente que invade lateralmente o nível de extremidades cecais; alça ascendente principalmente intercecal, preenchendo o espaço intercecal e intertesticular; em espécimes maiores, as alças descendente e ascendente tendem a invadir o ceco. Ovos numerosos. Vesícula excretora e ductos não observados.

Hospedeiros: *Pimelodella cristata* (Müller & Troschel) (Siluriformes: Heptapteridae), *Tetranematichthys quadrifilis* (Kner) (Siluriformes: Auchenipteridae); *Pterodoras granulosus* (Valenciennes) (Siluriformes: Doradidae).

Localidades: Rio Marapanim, Igarapé-açu, Pará, Brasil (01°07'44 "S; 47°37'12" O) e Iquitos, Região de Loreto, Peru (bacia do rio Amazonas) (03°45'60 "S; 73°14'44" O).

Sítio de infecção: intestino.

Parâmetros de infecção: *P. cristata* (Brasil): Um peixe infectado com um digenético de dois peixes examinados, ou seja, 1/2 (1); *P. cristata* (Peru): 1/2 (1); *P. granulosus* (Peru): 1/32 (2); *T. quadrifilis* (Brasil): 1/2 (3).

Sequências de DNA representativas: Não disponível.

Material estudado: Um espécime coletado em *Pimelodella cristata* (Müller & Troschel) (PAIA 49) e um em *Tetranematichthys quadrifilis* (Kner, 1858) (PAIA 01 – IPCAS D-790/2), rio Maracanã em Igarapé-açu, Pará, Brasil, 15/07/2016, coletado por A. Pereira e C. Pantoja; um coletado em *P. cristata* (PI 183 – IPCAS D-790/1) e três em *Pterodoras granulosus* (Valenciennes) (PI 1000, 1001), Iquitos, Loreto, Peru, 13/04/2005 e 19/04/2018, coletado por T. Scholz.

Diagnose diferencial: A nova espécie é colocada em *Microrchis* com base na combinação da faringe que tem os sacos intramurais e um esfíncter anterior, característico do tipo "microrchis" de Näsmark (1937), um bulbo esofágico presente, as extremidades do ceco não se aproximam do acetábulo, os testículos são inteiros e subesféricos, o poro genital é proximamente pós-bifurcal, o útero forma extensas alças descendentes, os campos dos folículos vitelinos não se estendem anteriormente ao testículo anterior nem atingem as extremidades cecais. Todas as quatro espécies têm um entalhe posteromedial na borda posterior do acetábulo.

O gênero foi proposto por Daday (1907) para acomodar *Microrchis megacotyle* (Diesing, 1836) (sin. *Amphistoma megacotyle* Diesing, 1836; espécie tipo) e *Microrchis ferrumequinum* (Diesing, 1836) (sin. *Amphistoma ferrumequinum* Diesing, 1836) (Daday 1907). A terceira espécie, *Microrchis oligovitellum* Lunaschi, 1987, foi descrita a partir de *Luciopimelodus pati* (Valenciennes) e *Trachycorystes striatulus* (Steindachner) na Argentina por Lunaschi (1987).

A nova espécie difere das três espécies conhecidas de *Microrchis* porque os testículos são diretamente tandem, não oblíquos e o ovário situado entre as extremidades cecais é amplamente separado dos testículos. Difere ainda de *M. megacotyle* e *M. ferrumequinum* porque o ovário é maior que os testículos, um caráter que compartilha apenas com *M. oligovitellum*, que é, no entanto, a única espécie descrita com poro genital bifurcal em vez de estreitamente pós-bifurcal. Folículos vitelínicos restritos a dois campos laterais muito curtos cobrindo ceco, logo depois do nível do ovário, e as alças uterinas que se estendem através do ceco ao longo do seu comprimento. Em *M. megacotyle*, o útero é inteiramente intercecal e em *M. ferrumequinum* estende-se um pouco além do nível das extremidades cecais, mas é intercecal. A nova espécie difere ainda mais de ambas em ter campos dos folículos vitelinos mais restritos, que não se estendem anteriormente ao nível do testículo posterior. Estes espécimes são, portanto, considerados novos.

Comentários: A nova espécie ocorre em peixes de duas famílias diferentes de Siluriformes de duas bacias hidrográficas da América do Sul, ou seja, os rios Amazonas e Marapanim. Yamaguti (1958) propôs a subfamília Microrchiinae para *Microrchis*

Daday, 1907 e *Travassosinia* Vaz, 1932. Reconhecida por Sey (1988, 1991), a subfamília foi posteriormente sinonimizada com Dadayiinae Fukui, 1929 por Jones (2005b).

Tabela 2. Medidas (em micrômetros) de *Microrchis* sp. a partir de diferentes hospedeiros coletados no Brasil e no Peru.

Hospedeiro	<i>Pimelodella cristata</i> (hospedeiro tipo)	<i>Pterodoras granulosus</i>	<i>Tetranematichthys quadrifilis</i>
País	Brasil	Peru	Brasil
Número de espécimes	2	1	1
Comprimento total (mm)	2.16–2.32	1.58	1.20
Largura máxima	436–605	389	215
Comprimento do acetábulo	461–471	299	300
Largura do acetábulo	347–379	300	230
Comprimento da faringe	172–191	86	114
Largura da faringe	145–152	94	106
Saco faringeano (direito)	32	38	22
Saco faringeano (esquerdo)	32–35	40	20
Comprimento do esôfago	232–374	411	210
Bulbo esofágico	63–73	97	68
Extremidade anterior até bifurcação cecal	458–475	420	265
Ceco (direito) (mm)	1.05–1.17	0.88	0.56
Ceco (esquerdo) (mm)	1.15–1.19	0.97	0.59
Comp. testículo anterior	103–107	126	39
Larg. testículo anterior	96–136	126	35
Comp. testículo posterior	99–120	110	52
Larg. testículo posterior	128–177	96	40
Comp. ovário	165–186	92	85
Larg. ovário	165–186	96	74
Ovos	colapsados	colapsados	colapsados

***Pronamphistoma* sp.**

Figura 1. B

Descrição baseada em seis espécimes, sendo quatro maduros.

Corpo minúsculo, 814–1035 (947; n = 6) longo, afilado anteriormente, com largura máxima 277–347 (310; n = 4) na região pré-acetabular. Acetábulo quase tão largo quanto o corpo, com 185–243 de comprimento e 262–307 de largura, com concentrações semelhantes a arco de fibras musculares circulares externas ventrais e dorsais fortemente desenvolvidas, arqueando-se na linha média nas regiões anterior e posterior do acetábulo. Abertura oral terminal. A faringe tem 83–100 de comprimento e 57–71 de largura, com sacos faríngeos extramurais primários pareados, direito 56–83 de comprimento, esquerdo 57–79 de comprimento, cada um ligeiramente mais volumoso que a faringe. Esôfago de comprimento médio, 83–164, flexionado. Bulbo esofágico presente, 52–59 de comprimento. Fibras musculares claramente visíveis no esôfago e no bulbo; ambos delicados, mas bem desenvolvido. Os cecos razoavelmente retos, largos, as extremidades geralmente se sobrepõem à borda anterior do acetábulo ou podem não conseguir alcançá-lo; Ceco direito 420–562 de comprimento, ceco esquerdo 410–595 de comprimento. Testículos no terço médio do corpo, intercecais, arredondado, inteiros, geralmente muito ligeiramente oblíquo, em tandem contíguo, testículo anterior de 95 a 215 de comprimento e 98 a 249 de largura, testículo posterior de 116 a 214 de comprimento e 116 a 268 de largura. Saco do cirro presente, arredondado, contém vesícula seminal interna. Poro genital imediatamente pós-bifurcal, mediano, rodeado por tecido glandular. Ovário arredondado, 41–93 de comprimento e 50–56 de largura, mediano ou submediano, ligeiramente anterior ao nível das extremidades cecais e não tão próximo ao acetábulo, contíguo com o testículo posterior ou não. A glândula de Mehlis parece ser póstero-dorsal ao ovário. Canal de Laurer não observado. Folículos vitelínicos em campos laterais ao longo do ceco, aproximadamente do nível intertesticular, quase até as extremidades cecais; os folículos invadem a linha média ao nível do complexo ovariano, tornando-se confluentes. Útero de paredes finas de difícil visualização; espécimes grávidos contendo de 2 a 9 ovos grandes em nível do ovário e do testículo posterior. Vesícula excretora e poro excretor não observados.

Hospedeiro: *Heros* sp. (Perciformes, Cichlidae).

Localidade: Rio Marapanim, Igarapé-açu, Pará, Brasil (01°07'44 "S; 47°37'12" O).

Sítio de infecção: intestino.

Parâmetros de infecção: 1/5 (8).

Sequências de DNA representativas: Não disponível.

Diagnose diferencial: A nova espécie foi colocada em *Pronamphistoma* Thatcher, 1992, que foi proposto para o tipo e, até o momento única espécie, *P. cichlasomae* Thatcher, 1992, descrita por Thatcher (1992) de *Heros severus* Haeckel no Brasil (Rondônia). Embora os presentes espécimes se assemelhem a *P. cichlasomae*, eles diferem significativamente desta espécie, cujo holótipo e parátipos (INPA 454 e 455a-j) foram estudados. As semelhanças incluem o pequeno tamanho do corpo, testículos intercecais (figurados como levemente oblíquos em tandem por Thatcher 1992), poro genital pós-bifurcal, ovário próximo ao testículo posterior e o pequeno número de ovos relativamente grandes.

As diferenças entre a nova espécie e *P. cichlasomae* são a ausência da expansão anterior em forma de colar descrito nas espécies-tipo, a presença de sacos faríngeos extramurais ao invés de intramurais e o desenvolvimento incomum de fibras musculares circulares dorsais e ventrais no acetábulo da nova espécie. Além disso, a configuração em leque dos folículos vitelínicos descrito por Thatcher (1992) não foi observada nos presentes espécimes, nos quais os folículos se estendem ao longo do ceco em campos laterais, com alguns invadindo a linha média ao nível do complexo ovariano tornando-se amplamente confluentes. A expansão anterior em forma de colar descrita por Thatcher (1992) é visível em alguns, mas não em todos os espécimes da série tipo, mas parece ser uma característica genuína consistentemente presente na maioria.

Expansões tipo colar próximas à extremidade anterior em vários cladorquídeos foram tratadas em nível genérico por vários autores e parecem ser uma característica consistente nos táxons em que foram descritos. Esse caractere não foi visto em nossos espécimes.

Thatcher (1992) descreveu os sacos faríngeos em *P. cichlasomae* como intramurais, mas eles são claramente extramurais em nossos espécimes. Ele descreveu o esôfago como curto, mas pode ter sido flexionado e parcialmente ocultado pela faringe. O desenvolvimento de fibras musculares circulares dorsais e ventrais observadas no acetábulo de nossos espécimes não foi mencionado por Thatcher (1992), mas pode não ter sido observado ou considerado por ele. Ao comparar nossos espécimes com as montagens de lâminas da espécie tipo *P. cichlasomae*, estamos cientes de que a qualidade está inferior à ideal e isso torna difícil fazer comparações tão completas quanto desejaríamos. No entanto, consideramos que os caracteres diferenciais apresentados acima justificam o status de uma nova espécie para os presentes espécimes.

Comentários: Devido à adição de outra espécie ao gênero anteriormente monotípico, o diagnóstico genérico de *Pronamphistoma* requer alterações apresentadas abaixo.

***Pronamphistoma* Thatcher, 1992**

Diagnose genérica alterada: Corpo pequeno, cônico anteriormente; largura máxima na região pré-acetabular. Expansão do tipo colar anterior presente ou ausente. Acetábulo sem entalhe pósteromedial na borda posterior; série de fibras musculares dorsal e ventral bem desenvolvidas ou não na parte exterior. Abertura oral terminal. Faringe com sacos faríngeos primários pareados intra ou extramurais. Bulbo esofágico presente. Cecos largos, atingindo o acetábulo ou não. Testículos ovoides, inteiros, interceais no terço médio do corpo, contíguos, obliquamente tandem. Saco do cirro, contendo vesícula seminal interna. Poro genital proximamente pós-bifurcal, rodeado por tecido glandular. Ovário arredondado ou esférico, mediano ou submediano, logo anterior às extremidades cecais, contíguo com testículo posterior ou não. Canal de Laurer não observado. A glândula de Mehlis posterodorsal ao ovário. O útero contém poucos e grandes ovos. Folículos vitelínicos nos campos laterais ao longo do ceco, desde o nível intertesticular, quase até as extremidades cecais, amplamente confluentes ao nível do ovário, ou formam uma configuração em leque de cada lado. Vesícula excretora sacular. No intestino de peixes ciclídeos (*Heros* spp.), Brasil.

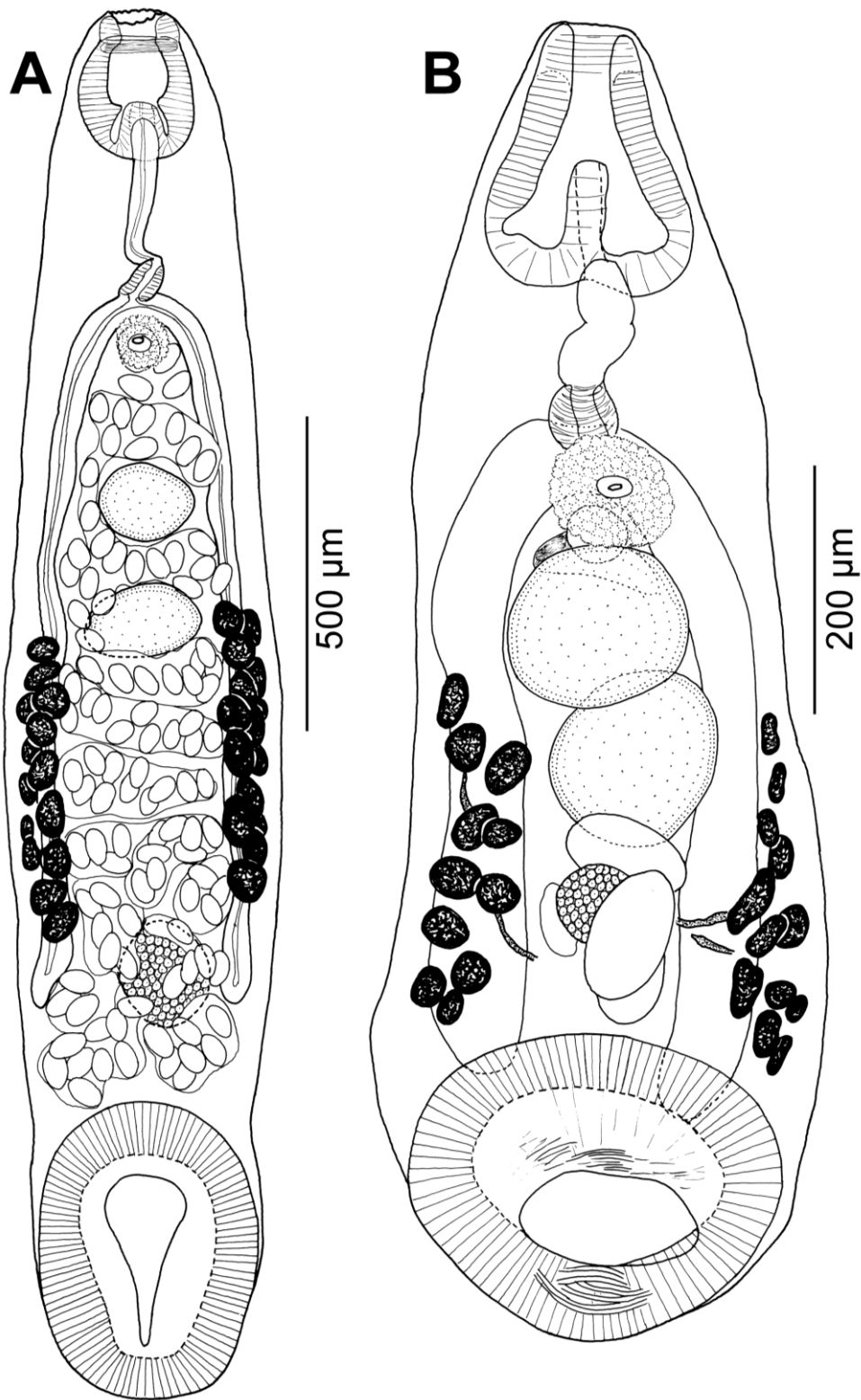


Figura 1. *Microorchis* sp. de *Pimelodella cristata* (Müller & Troschel), Brasil; vista ventral (A); *Pronamphistoma* sp. de *Heros* sp., Brasil; vista ventral (B).

Dadayius marenzelleri (Daday, 1907) Fukui, 1929

Sin. *Amphistoma oxycephalum*, Diesing (1836) (partim); *Diplodiscus marenzelleri* Daday, 1907

Material estudado: material tipo (veja abaixo); três espécimes de *Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus) (PA 146 - IPCAS D-792/1), Rio Marapanim, Igarapé-açu, Pará, Brasi, 31/07/2016, A. Pereira e C. Pantoja

Hospedeiro tipo: '*Salmo* sp.' (um peixe Characiforme, provavelmente, um serrasalmídeo).

Localidade tipo: Não mencionada explicitamente (Cuiabá, MT ou rio Paraná, Brasil).
Série tipo: lâminas 980 e 984 da coleção de Diesing (1836) no Museu de História Natural de Viena (ZMW).

Outros hospedeiros: *Mylossoma aureum* (Spix & Agassiz) (Characiformes: Serrasalmidae); *Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus)* (Siluriformes: Auchenipteridae).

Sítio de infecção: intestino.

Taxa de infecção: *T. galeatus*: 1/27 (5).

Distribuição: Brasil (localidade tipo: não especificado; Rio Marapanim, Igarapé-açu, Pará, Brasil - nova localidade).

Sequências de DNA representativas: Não disponível.

Comentários: A espécie foi descrita como *Diplodiscus marenzelleri* por Daday (1907) que encontrou uma mistura de espécies em duas lâminas de Diesing (1836) de "*Salmo* sp." Ele diferenciou sua nova espécie da única conhecida de peixe, *Diplodiscus cornu* (Diesing), pela presença de uma 'ventosa genital' (ausente em *D. cornu*). Os presentes espécimes correspondem em sua morfologia, incluindo o tamanho total do corpo e o tamanho relativo da faringe e da "ventosa genital". De fato, não há uma verdadeira ventosa genital neste táxon nem em *D. pacuensis* (veja abaixo). A área ao redor do poro genital é levemente elevada e glandular, mas não possui estrutura semelhante a uma ventosa verdadeira.

***Dadayius pacuensis* Thatcher, Sey & Jégu, 1996**

Figura 2. A-C

Material estudado: material tipo (veja abaixo); 50 espécimes coletados em *Metynnis lippincottianus* (Cope), Rio Marapanim, Igarapé-açu, Pará, Brasil, 19/07/2016, A. Pereira e C. Pantoja (IPCAS D-793/1?); cinco espécimes de *M. lippincottianus*, Iquitos, Província de Loreto, Peru, 16/04/2005, T. Scholz (IPCAS D-793/1?).

Hospedeiro tipo: *Myloplus rubripinnis* (Müller & Troschel) (Characiformes: Serrasalmidae).

Localidade tipo: Rio Jatapu, Amazonas, Brasil.

Série tipo: Holótipo INPA 203; parátipos INPA 203a – e.

Hospedeiros adicionais: *Metynnis hypsauchen* (Müller & Troschel), *M. lippincottianus**, *Myloplus asterias* (Müller & Troschel), *Myloplus* sp. (Characiformes: Serrasalmidae).

Sítio de infecção: intestino.

Parâmetros de infecção: *M. lippincottianus* (Brasil): 12/16 (38; máximo 81 trematódeos); *M. lippincottianus* (Peru): 1/1 (16).

Distribuição: Brasil (Rio Marapanim, Igarapé-açu, Pará - nova localidade); Peru (Iquitos, Loreto - nova localidade).

Sequências de DNA representativas: Não disponível.

Comentários: O novo material coletado em *Metynnis lippincottianus* corresponde a *D. pacuensis* incluindo seu holótipo (INPA 203) e parátipos (INPA 203b, e). *Dadayius pacuensis* foi descrito de *Myloplus rubripinnis* por Thatcher et al. (1996) e diferenciado do tipo e única espécie, *D. marenzelleri*, pelo acetábulo maciço, faringe relativamente grande, ventosa genital e tamanho corporal menor (metade do tamanho das espécies-tipo - Thatcher et al. 1996). Esse acetábulo maciço possui cristas transversais incompletas na superfície luminal. Tanto *D. marenzelleri* quanto *D. pacuensis* foram descritos com essas cristas, que Thatcher et al. (1996) consideraram como um caráter genérico. *D. marenzelleri* foi ilustrado por Thatcher et al. (1996) com testículos diretamente tandem. O tamanho dos nossos espécimes de *Metynnis lippincottianus* é consistente com esta espécie, mas, de acordo com o diagnóstico genérico de Thatcher et al. (1996), tem uma ventosa genital e não possui um saco do cirro. Um saco do cirro de parede fina foi observado nos presentes espécimes e os testículos são obliquamente em tandem.

No entanto, duas outras espécies em *Dadayius*, *D. pacupeva* Lacerda, Takemoto & Pavanelli, 2003 e *D. puruensis* Lopes, Karling, Takemoto, Rossoni, Ferreira & Pavanelli, 2011, foram descritas como desprovidas de cristas transversais visíveis (LACERDA et al., 2003; LOPES et al., 2011). Nossos espécimes se assemelham a *D. pacupeva* em ter testículos obliquamente em tandem (descritos como tandem em *D. pacupeva*, mas figurados como obliquamente tandem) e o ovário entre as extremidades cecais, mas diferem no tamanho maior do acetábulo em relação ao corpo e a presença de cristas transversais na superfície luminal. O ceco alcança ou quase alcança o acetábulo, saco do cirro está presente e não há nenhuma ventosa genital (veja figura 2). A área ao redor do poro genital é ligeiramente elevada e glandular, mas não possui uma estrutura semelhante a uma ventosa como definido por Näsmark (1937) e Eduardo (1982). Uma ventosa genital foi interpretada de diferentes maneiras por diferentes autores; a interpretação aqui é a dos dois autores acima. Nossos espécimes não podem ser identificados como *D. pacupeva*.

Nossos espécimes também não podem ser *D. puruensis*, que diferem aparentemente na ausência de cristas transversais na superfície luminal do acetábulo e um entalhe acetabular póstero-medial. Além disso, esta espécie foi descrita com a presença de uma ventosa genital, folículos vitelínicos anteriores ao arco cecal e um ovário em forma de arco. A posição dos folículos vitelínicos, se confirmada, seria altamente incomum para a superfamília. O saco do cirro foi considerado ausente ou não observado e o útero e os ovos não foram observados. Isto sugere que estes espécimes estavam imaturos. Esses espécimes são os mais próximos de *D. pacuensis*, mas o gênero requer revisão e reexame de toda a série tipo para esclarecer a interpretação da presença ou não da ventosa genital e averiguar se a ausência relatada do saco do cirro e de cristas transversais em alguns táxons resulta de uma dificuldade de observá-los.

***Dadaytrema gracile* Lunaschi, 1989**

Figuras 2. D – H

Material estudado: cinco espécimes de *Pimelodella gracilis* (Valenciennes) (BR-MS 99 - IPCAS D-794/1); três espécimes de *Pimelodella megalura* Miranda Ribeiro (BR-MS 40, 41, 66 - IPCAS D-794/2); cinco espécimes de *Pimelodus fur* (Lütken) (BR-MS 42, 47, 48, 58, 112 - IPCAS D-794/4), todos coletados no rio Miranda, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil, 22/10/2015, C. Pantoja e T. Scholz; três espécimes de *Pimelodus blochii* Valenciennes (BR-RO 61, 62), Rio Quatro Cachoeiras, Ariquemes, Rondônia, Brasil, 9/10/2015, T. Scholz (IPCAS D-794/3).

Hospedeiro tipo: *Pimelodella gracilis* (Valenciennes) (Siluriformes: Heptapteridae).
Localidade tipo: Arroyo Brazo Chico, bacia do rio Uruguai, província de Entre Ríos, Argentina.
Série tipo: 6 espécimes maduros e 7 imaturos na Colección helmintológica, Museu de La Plata, Argentina (N° 1289C-1306C).
Hospedeiros adicionais (novos): *Pimelodella megalura* (Siluriformes: Heptapteridae); *Pimelodus blochii*, *P. fur* (Siluriformes: Pimelodidae).
Sítio de infecção: intestino.
Parâmetros de infecção: *P. gracilis*: 1/1 (14); *P. megalura*: 3/3 (2); *P. blochii*: 2/8 (3); *P. fur*: 5/13 (7).
Distribuição: Argentina, Brasil (Rio Miranda, Pantanal, Mato Grosso do Sul, 20 ° 11'27 "S; 56 ° 30'19" O; Rio Quatro Cachoeiras, Ariquemes, Rondônia, 10 ° 01'S; 63 ° 03'O - ambas novas localidades).
Sequências de DNA representativas: 28S rDNA, ITS2 rDNA e *cox1* mtDNA

Comentários: A espécie foi descrita por Lunaschi (1989) do heptapterídeo *Pimelodella gracilis* da Província de Entre Rios, na Argentina (bacia do rio Paraná). Foi diferenciada de *D. oxycephalum* pela posição oblíqua dos testículos diferente da posição em tandem, que são quase inteiros, e pela posição extracecal do útero (versus quase exclusivamente intercecal em *D. oxycephalum*). Novo material coletado da mesma bacia hidrográfica da localidade tipo e na bacia do rio Amazonas amplia a distribuição da espécie e o espectro de seus hospedeiros definitivos para incluir *P. megalura* e dois pimelodídeos, *Pimelodus blochii* e *Pimelodus fur*. Pela primeira vez, a espécie foi estudada usando MEV e detalhes sobre distribuição e aparência de papilas ao redor da extremidade anterior, que não foram relatadas na descrição original, são fornecidos. As papilas são dispostas em vários círculos concêntricos ao redor da extremidade anterior em forma de cúpula e ciliares. A borda acetabular também parece ter papilas em forma de cúpula. Como o sufixo latim "trema" é neutro e não feminino, o nome da espécie é alterado para *D. gracile*.

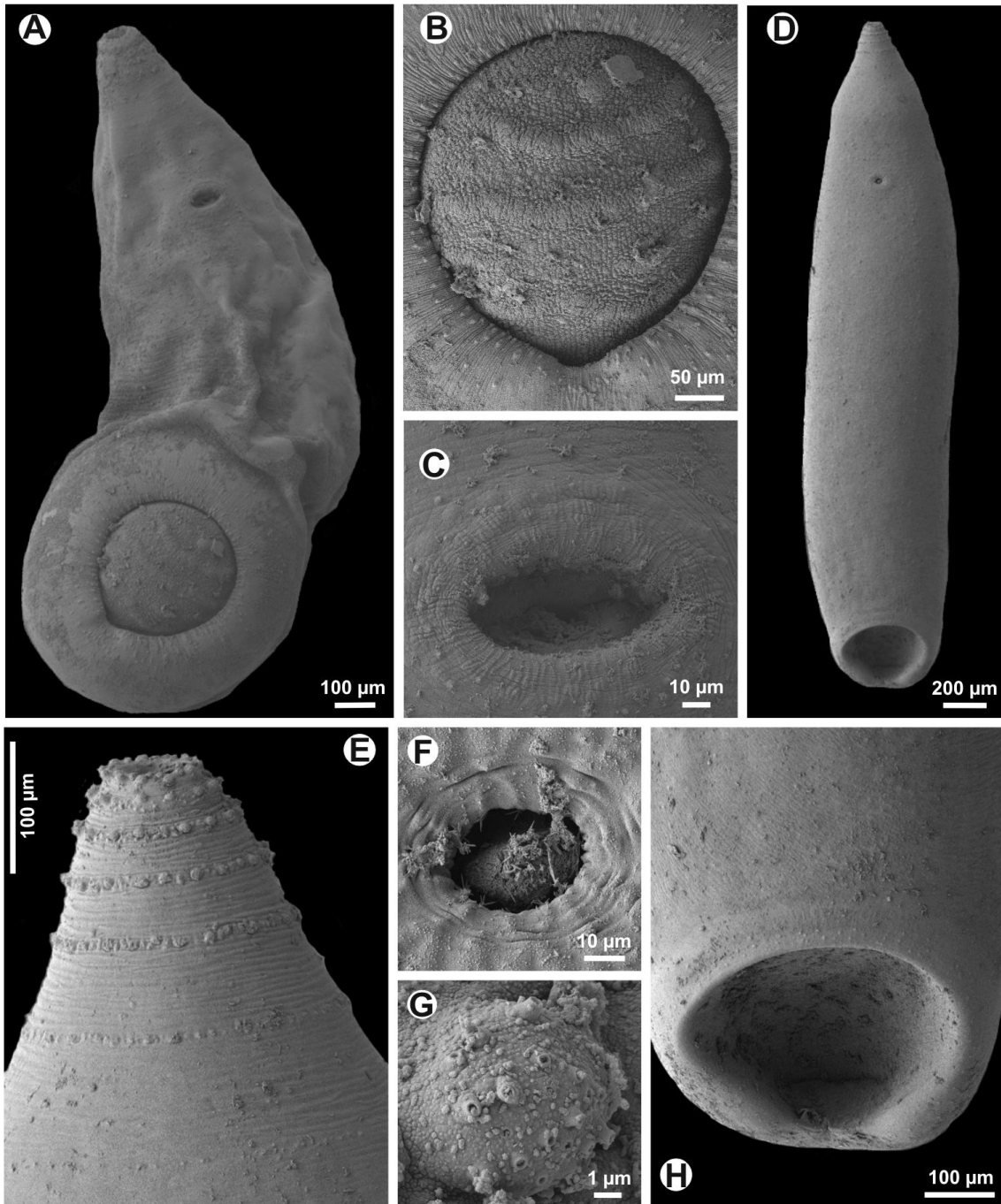


Figura 2. Micrografias de *Dadayius pacuensis* Thatcher, Sey & Jégu, 1996 coletado em *Metynnis lippincottianus* (Cope), Brasil (A–C) e *Dadaytrema gracile* Lunaschi, 1989 em *Pimelodella gracilis* (Valenciennes), Brasil (D–H). A, vista ventral; B, acetábulo com cristas transversais na superfície luminal; C, poro genital mostrando a ausência de uma ventosa genital; D, vista ventral; E, extremidade anterior mostrando a distribuição das papilas; F, poro genital; G, detalhes de uma única papila da extremidade anterior; H, acetábulo.

Dadaytrema minimum Vaz, 1932

Figura 3. A – D

Material estudado: Um espécime coletado em *Calophysus macropterus* (Lichtenstein, 1819) (PI 101) e 10 em *Pterodoras granulosus* (PI 350, 441, 758, 829, 981, 982, 1000, 1001), Iquitos, Peru, 09/09/2006, 03/03/2011, 15/04/2018; cinco espécimes em *Pimelodus* sp. (TO 23c), Rio Araguaia em Santa Isabel, Pará, Brasil, 23/10/2014; cinco espécimes em *Tocantinsia piresi* (Miranda Ribeiro) (BR-X 58a), rio Xingu em Altamira, Pará, Brasil, 24/04/2013 (IPCAS D-795/1), todos os espécimes coletados por T. Scholz. Hospedeiro tipo: *Myleus* sp. (= *Myloplus* sp.) (Pacu branco) (Characiformes: Serrasalminidae).

Localidade tipo: Rio Paranapanema, São Paulo, Brasil.

Série tipo: Holótipo e parátipos na Coleção Helminológica do Instituto Biológico de São Paulo, Brasil (n° 461).

Hospedeiros adicionais (todos novos): *Calophysus macropterus*, *Pimelodus* sp. (Siluriformes: Pimelodidae); *Pterodoras granulosus* (Siluriformes: Doradidae); *Tocantinsia piresi* (Siluriformes: Auchenipteridae).

Sítio de infecção: intestino.

Parâmetros de infecção: *C. macropterus* (Peru): 1/35 (1); *Pimelodus* sp. (Brasil): 1/1 (5); *P. granulosus*: 21/33 (3; mimo 15); *T. piresi*: 1/2 (5).

Distribuição: Brasil (Rio Paranapanema, São Paulo; Rio Araguaia, Santa Isabel, Pará, 06 ° 05'23 "S; 48 ° 16'46" W; Rio Xingu, Altamira, Pará, 3 ° 35'45 "S; 51 ° 49'01 "O - ambas as novas localidades); Peru (Iquitos, Loreto, 03°45'60 "S; 73°14'44" O - nova localidade).

Seqüências de DNA representativas: 28S rDNA, ITS2 rDNA e *cox1* mtDNA

Comentários: A espécie foi descrita como *D. minima* (o nome genérico é neutro e assim o fim do nome da espécie deve ser – um) do serrasalmídeo *Myleus* sp. (= *Myloplus* sp.) por Vaz (1932). Este autor não diferenciou esta espécie de *D. elongatum* e *D. oxycephalum*, apenas mencionou seu pequeno tamanho (comprimento total de 2,0 a 2,5 mm; largura máxima de 1,3 a 1,5 mm) e um esôfago muito curto. Com base nos dados de Vaz (1932), também foi possível distinguir esta espécie de *D. elongatum* e *D. oxycephalum* pela forma amplamente oval do corpo, estreitando-se progressivamente em direção à extremidade anterior. Embora Heyneman et al. (1960) e Vicente et al. (1978) sinonimizaram todas as três espécies, eles não forneceram argumentos convincentes para essa sinonímia. Além disso, os dados moleculares evidenciam inequivocamente a existência de pelo menos três espécies separadas de *Dadaytrema* (ver Figuras 7, 8 e 9).

O presente estudo amplia consideravelmente o espectro de hospedeiros definitivos dessa espécie e também fornece pela primeira vez fotografias de MEV. Estas fotografias revelaram claramente a forma oval do corpo (Figura 3A). Embora muitos espécimes estejam aparentemente contraídos, eles parecem ter uma forma semelhante do corpo conforme descrito por Vaz (1932). Os cecos não são tão laterais como figurado por Vaz (1932), mas os espécimes têm um esôfago bastante curto, o que corresponde à descrição original. Portanto, nós os consideramos como coespecíficos. As fotos de MEV também mostraram a presença de papilas ao redor da extremidade anterior e um entalhe posterior no acetábulo.

***Dadaytrema oxycephalum* (Diesing, 1836) Travassos, 1931**

Figura 3. E-J

Material estudado: um espécime coletado em *Ageneiosus inermis* (PI 886a - IPCAS D-796/1), Iquitos, Peru, 12/10/2011; um espécime em *Calophysus macropterus* (PI 101a -

D-796/2), Iquitos, Peru, 23/04/2004; quatro espécimes em *Oxydoras niger* (BR-AMP 100a, c - D-796/3?), Macapá, 24/05/2013, J. Luque, P. Vieira, T. Scholz e V. Freitas; um espécime em *O. niger* (PI 223a - D-796/3?), Iquitos, Peru, 19/04/2005; 24 espécimes (um hologenóforo) em *Piaractus brachypomus* (Cuvier) (BR-AMP 72a, 73a, 87a, 107a), Macapá, 24/5/2013, C. Pantoja; 35 espécimes em *Pterodoras granulatus* (PI 54b, 350a, c, 441a, 443a, 758b, 783a, 829c, 831b, 999a, 1000 - D-796/4?), Iquitos, Peru, 20.iv.2004, 09/09/.2006, 15/09/2006, 7/10/2011, 15/04/2018; 14 espécimes em *P. granulatus* (BR-MS 39c, 45b, 51a, 52b, 77b, 108a - D-796/4?), rio Miranda, Pantanal, Mato Grosso do Sul, 22/10/2014, 23/10/2014, 25/10/2015; sete espécimes de *P. granulatus* (BRPR 77b - D-796/4?), Rio Baía, Mato Grosso do Sul, 03/10/2014; todos os espécimes coletados por T. Scholz.

Hospedeiro tipo: Não designado por Diesing (1836) que listou os seguintes hospedeiros: *Salmo auratus* (= *Salminus brasiliensis* Valenciennes) (Characiformes: Characidae), *Salmo pacu* (= *Piaractus brachypomus* (Cuvier), *Salmo pacupeba* (= *Myloplus rhomboidalis* (Cuvier) (Characiformes: Serrasalminidae) e *Silurus megalcephalus* (*Pimelodus ornatus kneri*) (Siluriformes: Pimelodidae).

Localidade tipo: Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

Série tipo: Lâminas 977, 980-984, 988; como *Chiorchis oxycephalum*, Museu de História Natural de Viena.

Hospedeiros adicionais: *Colossoma macropomum* (Cuvier), *Myleus micans* (Lütken), *Myloplus asterias* (Müller & Troschel), *Mylosoma aureum* (Spix & Agassiz), *Myletes torquatus* Kner, *P. mesopotamicus* (Holmberg) (Characiformes: Serrasalminidae); *Ageneiosus inermis** (Linnaeus), *Tocantinsia piresi** (Siluriformes: Auchenipteridae); *Oxydoras niger** (Valenciennes), *Pterodoras granulatus* (Siluriformes: Doradidae); *Calophrysus macropterus**, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz) (Siluriformes: Pimelodidae).

Sítio de infecção: intestino.

Parâmetros de infecção: *A. inermis*: 1/18 (4); *C. macropterus*: 1/35 (3); *O. niger* (Brazil): 2/2 (11; maximum 22); *O. niger* (Peru): 1/17 (2); *P. brachypomus*: 4/5 (19; maximum 25); *P. granulatus* (Brasil – Amapá): 6/12 (31; maximum 105); *P. granulatus* (Brasil – Paraná): 1/5 (33); *P. granulatus* (Peru): 20/32 (14; maximum 49). Distribuição: Argentina, Brasil (estados do Amapá - nova localidade, Amazonas, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul - nova localidade, Minas Gerais, Pará, Paraná, São Paulo, Tocantins - nova localidade), Peru (Iquitos - nova localidade), Venezuela.

Sequências de DNA representativas: 28S rDNA, ITS2 rDNA e *cox1* mtDNA

Comentários: A espécie foi descrita como *Amphistoma oxycephalum* por Diesing (1836) a partir de várias espécies de serrasalmídeos e de *Pimelodus ornatus* em Mato Grosso, Brasil. Travassos (1931) transferiu as espécies para *Dadaytrema*. Esta espécie parece ser a mais abundante dentre os cladorquídeos que parasitam peixes neotropicais e ela ocorre em várias espécies de Characiformes e Siluriformes. No presente estudo, três novos hospedeiros foram relatados. Espécimes coletados em *P. granulatus* foram estudados usando MEV. Este estudo revelou detalhes da distribuição das papilas ao redor da extremidade anterior. Elas formam “anéis”, são cônicas e multiciliadas. Papilas em forma de cúpula são espalhadas na borda do acetábulo em torno de sua abertura e na superfície corporal adjacente.

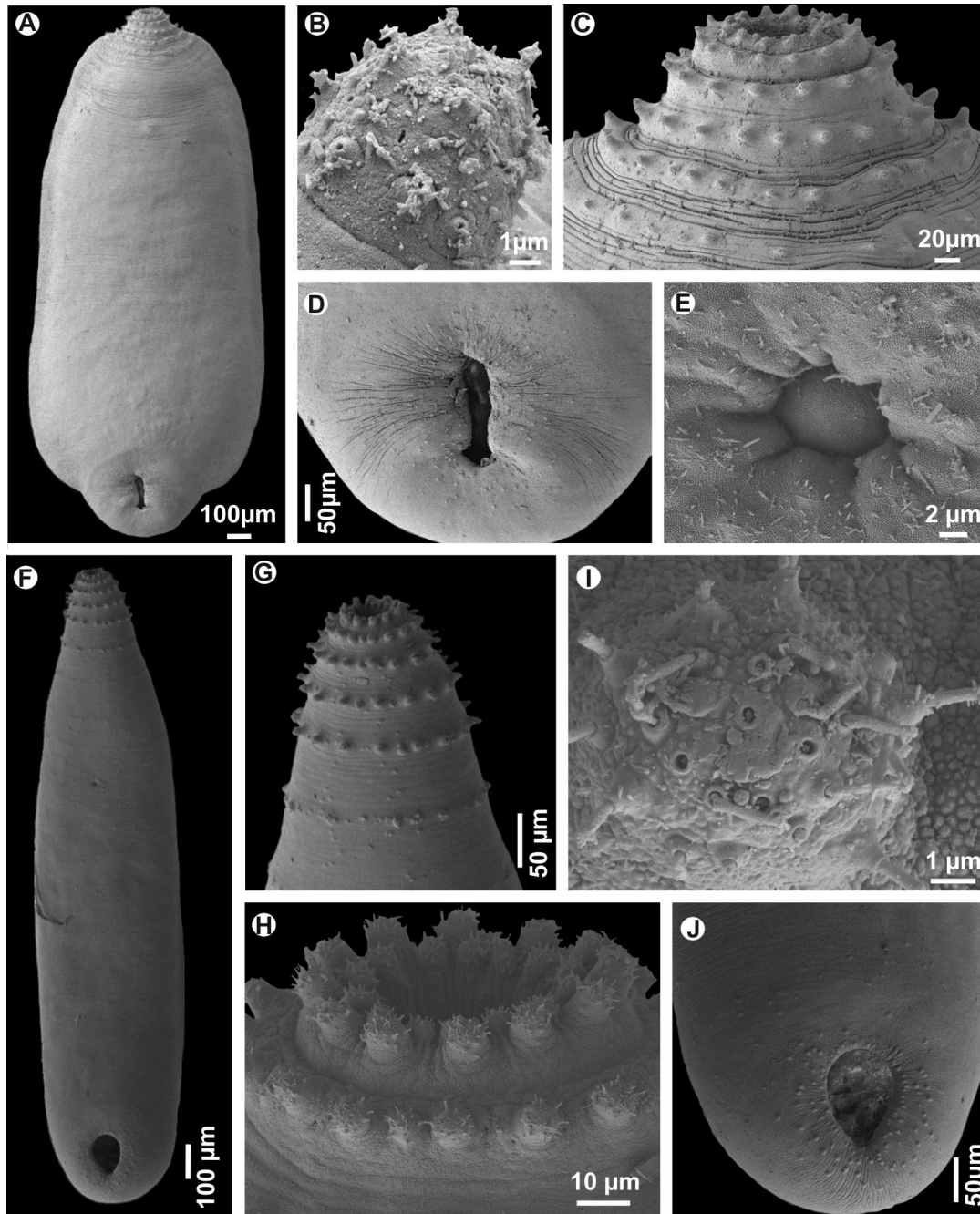


Figura 3. Micrografias de *Dadaytrema minimum* Vaz, 1932 coletado em *Tocantinsia piresi* (Miranda Ribeiro), Brasil (A–E) e *Dadaytrema oxycephalum* (Diesing, 1836) em *Pterodoras granulosus* (Valenciennes) ambas as espécies coletadas em Mato Grosso do Sul, Brasil (F–J). A, vista ventral; B, uma única papila da extremidade anterior; C, extremidade anterior mostrando a distribuição das papilas; D, acetábulo; E, poro genital; F – vista ventral; G, extremidade anterior mostrando a distribuição das papilas; H, papilas da região anterior; I, uma única papila da extremidade anterior; I – acetábulo mostrando o entalhe posterior.

***Deltamphistoma pitingaense* Thatcher & Jégu, 1996**

Material estudado: série tipo - INPA (veja abaixo); oito espécimes coletados em *Myloplus schomburgkii* Valenciennes (BRXJ 71, PAX 92, 93b, 96 – D-797/1), quatro espécimes em *Myleus setiger* Müller & Troschel (PAX 67, 68 – D-797/2), 15 espécimes em *Myloplus rubripinnis* (Müller & Troschel) (BRXJ73, PAX 44, 54), rio Xingu em Altamira, Pará, Brasil, 20/07/2016, coletados por J. Carneiro, J. Moreira e M. C. Moraes. Hospedeiro tipo: *Mylesinus paraschomburgkii* Jégu, Santos & Ferreira (Characiformes: Serrasalminidae).

Hospedeiros adicionais: *Myloplus schomburgkii**, *Myleus setiger**, *Myloplus rubripinnis** (Characiformes: Serrasalminidae).

Localidade tipo: rio Pitinga, Amazonas, Brasil.

Série tipo: Holótipo (INPA 191) e seis parátipos (INPA 192a-f); três parátipos (U.S. National Museum, Smithsonian Institutions, Washington, D.C., USA – USNM).

Sítio de infecção: intestino.

Parâmetros de infecção: *Myloplus schomburgkii* (Brasil): 4/6 (3); *Myleus setiger* (Brasil): 3/6 (3); *Myloplus rubripinnis*: 3/7 (127; maximum 200).

Distribuição: Brasil (Amazonas, rio Xingu, Altamira, Pará, Brasil, 3°35'45"S; 51°49'01"O – nova localidade).

Sequências de DNA representativas: não disponível

Comentários: O novo material coletado em três peixes serrasalmídeos (todos novos hospedeiros) corresponde bem em sua morfologia ao tipo e única espécie de *Deltamphistoma* Thatcher & Jégu, 1996, *D. pitingaense* Thatcher & Jégu, 1996. Esta espécie foi encontrada e descrita em *M. paraschomburgkii* em três rios no estado do Amazonas, Brasil por Thatcher e Jégu (1996). Assemelha-se muito a *Anavilhanatrema robustum* Thatcher, 1992, descrito a partir do serrasalmídeo *Pristobrycon striolatus* nas ilhas Anavilhana, Rio Negro, Amazonas, Brasil, com testículos grandes em tandem, muito mais largos que os sacos faríngeos extramurais longos e útero intercecal, mas difere pela ausência da crista anterior em forma de colar (presente em *A. robustum*), pela presença de um bulbo esofágico, poro genital pós-bifurcal, cecos intestinais que terminam longe do acetábulo, um ovário inteiro, não lobulado, e folículos vitelínicos intercecais (JONES, 2005b). Como os nomes genéricos com o sufixo “trema” são neutros, o nome da espécie tipo de *Anavilhanatrema* é corrigido para *A. robustum*.

***Doradamphistoma bacuense* Thatcher, 1999**

Figura 4. A-B

Material estudado: Material tipo depositado no INPA (veja abaixo); cinco espécimes coletados em *Megalodoras uranoscopus* (Eigenmann & Eigenmann) (PI 324b, 344, 581, 1077, 1084 – IPCAS D-798/1), Iquitos, Peru, 07/09/2006 e 23/04/2018, T. Scholz e R. Kuchta; Dois espécimes coletados em *M. uranoscopus* (PAX 75, 76), Rio Xingu River em Altamira, Pará, 22/07/2016, J. Carneiro, M.C. Moraes e J. Moreira; cinco espécimes coletados em *Oxydoras niger* (PEOX 01, 02 – IPCAS D-798/2), Tarapoto, San Martín, Peru, 13.04.2016, C. Cruces e J. Chero; Um espécime coletado em *Platydoras costatus* (Linnaeus) (PI 353a – D-798/3), Iquitos, Peru, 09/09/2006, T. Scholz.

Hospedeiro tipo: *Megalodoras irwini* (= *Megalodoras uranoscopus* AUTHORITY) (Siluriformes: Doradidae).

Localidade tipo: Manaus, Amazonas, Brasil.

Série tipo: Holótipo e cinco parátipos (INPA 371, 372a–e).

Hospedeiros adicionais: *Oxydoras niger** e *Platydoras costatus** (Siluriformes: Doradidae).

Sítio de infecção: intestino

Parâmetros de infecção: *M. uranoscopus* (Brasil): 2/3 (3); *M. uranoscopus* (Peru): 5/7 (3; maximum 9); *O. niger* (Peru): 2/2 (9); *P. costatus* (Peru): 1/1 (3).

Distribuição: Brasil (Amazonia; rio Xingu, Pará – nova localidade), Peru (Tarapoto, San Martín Region, 6°29'S; 76°22'E – nova localidade).

Sequências de DNA representativas: 28S rDNA, ITS2 rDNA e *cox1* mtDNA

Comentários: Esta espécie foi descrita a partir de *Megalodoras irwini* (= *M. uranoscopus*) em Manaus, Amazonas, Brasil, e um novo gênero, *Doradamphistoma* Thatcher, 1999, foi proposto para acomodá-la por Thatcher (1999). Como a terminação do nome genérico é neutra, o nome da espécie é corrigido aqui para *D. bacuense*. O gênero foi caracterizado por possuir uma faringe bem desenvolvida, sacos faríngeos extramurais bem desenvolvidos, esôfago longo, cecos sinuosos se aproximando da margem anterior do acetábulo, testículos na diagonal, equatorial ou pré-equatorial, poro genital pós-bifurcal e ovário pós-equatorial (representado como anterior às extremidades cecais). As únicas diferenças entre a descrição de Thatcher (1999) de *D. bacuense* e os presentes espécimes são a presença de um esfíncter faríngeano anterior, que ele não relatou ou ilustrou, e na forma do acetábulo, que tem um entalhe pósteromedial não descrito por Thatcher, mas confirmado no estudo da série tipo (Figura 4). Nosso material do Brasil e do Peru expande o espectro de hospedeiros definitivos para incluir outras duas espécies de Siluriformes, os doradídeos *O. niger* e *P. costatus*. O Peru representa um novo recorde geográfico para a espécie, anteriormente conhecido apenas da bacia do rio Amazonas no Brasil. Além disso, novos espécimes também nos permitiram fornecer as primeiras micrografias de MEV da espécie. Os dados moleculares indicam uma estreita relação entre *D. bacuensis* e *Dadaytremoides parauchenipteri*, um parasito de bagres auchenipterídeos e pimelodídeos (ver abaixo).

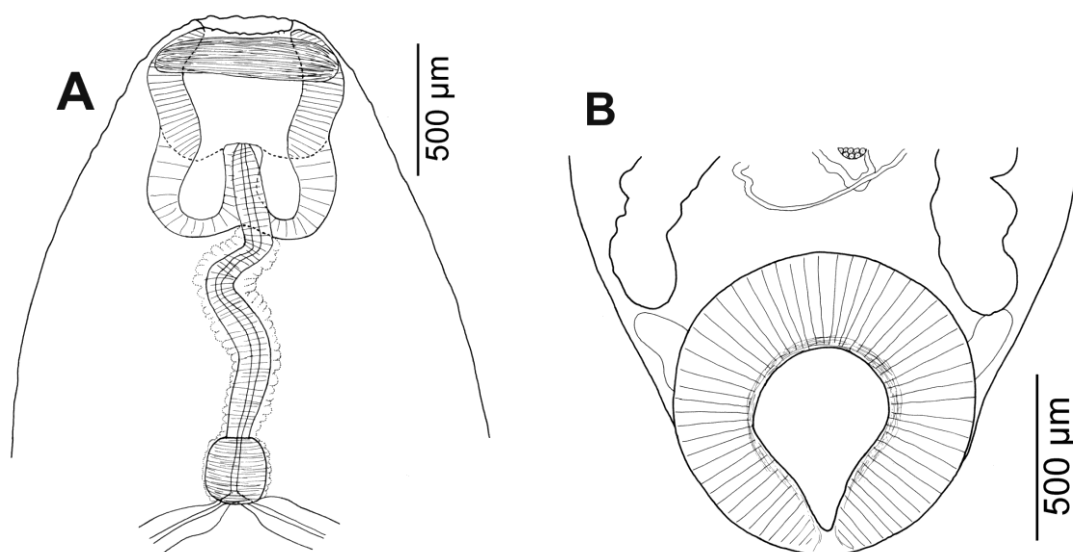


Figura 4. A–B – *Doradamphistoma bacuense* Thatcher, 1999 de *Megalodoras uranoscopus* (Eigenmann & Eigenmann), Brasil; **A**, extremidade anterior; **B**, acetábulo de um parátipo (INPA 372c).

Doradamphistoma parauchenipteri (Lunaschi, 1989) **comb. nov.**

Sin. *Dadaytremoides parauchenipteri* Lunaschi, 1989

Figura 5

Material estudado: um espécime coletado em *Ageneiosus inermis* (PI886) e seis espécimes em *Trachelyopterus galeatus* (PI 436, 799, 803, 820), Iquitos, Peru, 3/10/2011, T. Scholz; dois espécimes em *Brachyplatystoma vaillantii* (Valenciennes) (BR-AMP59), Macapá, Amapá, Brasil, 16.10.2017, C. Pantoja; 15 espécimes em *T. galeatus* (PAIA 64, 123, 124, 125, 126, 145, 146, 160, 161, 163, 164, 166, 168, 187, 198), Maracanã River em Igarapé-açu, Pará, Brasil, 16.07.2016, C. Pantoja; 13 espécimes em *T. galeatus* (BR-PR 25, 26, 41, 65, 66, 67, 71, 72, 82, 84, 142, 221), rio Paraná em Porto Rico, Paraná, Brasil, 02/02/2014, T. Scholz.

Hospedeiro tipo: *Trachelyopterus galeatus* (Siluriformes: Auchenipteridae).

Localidade tipo: Arroyo Brazo Chico, Rio Uruguay, Província de Entre Ríos, Argentina.

Série tipo: Três espécimes, todos achatados na Colección Helmintológica, Museo de La Plata, Argentina (Números 1315C e 1316C).

Hospedeiros adicionais: *A. inermis**, *Trachelyopterus coriaceus* Valenciennes (Siluriformes: Auchenipteridae); *B. vaillantii** (Siluriformes: Pimelodidae).

Sítio de infecção: intestino.

Parâmetros de infecção: *A. inermis* (Peru): 1/1 (1); *B. vaillantii* (Brasil): 1/4 (2); *T. galeatus* (Pará, Brasil): 15/25 (2); *T. galeatus* (Paraná, Brasil): 12/16 (4; maximum 27); *T. galeatus* (Peru): 13/24 (2).

Distribuição: Argentina (Província de Entre Ríos), Brasil (rio Igarapé Fortaleza, Macapá, Amapá, 00°02'20"N; 51°03'59"O – nova localidade; rio Maracanã, Igarapé-açu, Pará

01°07'44"S; 47°37'12"O – nova localidade; rio Paraná, Porto Rico, Paraná, 20°45'S; 53°16'O – nova localidade); Peru (Iquitos, Loreto – nova localidade). Sequências de DNA representativas: 28S rDNA, ITS2 rDNA e *cox1* mtDNA

Comentários: A espécie foi descrita de *Parauchenipterus galeatus* (= *Trachelyopterus galeatus*) da Argentina por Lunaschi (1989). A espécie é caracterizada por possuir uma faringe grande com um esfíncter anterior maciço, útero extenso com numerosas alças extracecais desde o nível esofágico até o acetábulo, entalhe posterior na borda do acetábulo, testículos diagonais e poucos folículos vitelínicos situados muito anteriormente ao acetábulo (LUNASCHI, 1989). Além de numerosos espécimes encontrados no hospedeiro tipo *T. galeatus*, das bacias dos rios Paraná e Amazonas, foram encontrados também em dois novos hospedeiros definitivos, ambos da ordem Siluriformes, o auchenipterídeo *A. inermis* e o pimelodídeo *B. vaillantii*. A ocorrência de *D. parauchenipteri* no hospedeiro tipo foi também confirmada por dados moleculares (Figuras 7 e 9). Utilizando MEV, o entalhe póstero-medial no acetábulo e papilas ao redor da extremidade anterior foram claramente observados (figura 6).

Embora *Dadaytremoides parauchenipteri* e *Doradamphistoma bacuense* tenham sido originalmente designados para dois gêneros distintos, eles compartilham algumas características, tais como, a faringe com sacos extramurais, posição e o pequeno tamanho dos testículos, um entalhe posterior no acetábulo, um bulbo esofágico e um poro genital pós-bifurcal. Ambas as espécies também compartilham um padrão semelhante de distribuição das papilas na extremidade anterior do corpo (Figura 6). Embora existam deficiências nas descrições originais das duas espécies e da espécie tipo de *Dadaytremoides*, *D. grandistomis* Thatcher, 1979, alguns esclarecimentos e confirmações foram possíveis pelos estudos dos tipos e observações de espécimes adicionais coletados no Brasil e no Peru.

Lunaschi (1989) descreveu *Da. parauchenipteri* e comparou-o apenas com *D. grandistomis*, a única opção disponível para ela naquele momento. Dez anos depois, Thatcher (1999) propôs *Doradamphistoma*, comparando-o apenas com *Pacudistoma turgida* Thatcher, 1992 e presumivelmente não estava ciente do trabalho de Lunaschi (1989) porque ele não listou em seu livro de 2006 *parauchenipteri* como uma espécie de *Dadaytremoides* e também não fez nenhuma referência à Lunaschi.

Doradamphistoma bacuense e *Da. parauchenipteri* se assemelham a um grau que sugere que eles sejam congêneres, mas podem diferir em nível de espécie. Eles se assemelham um ao outro na: faringe com um esfíncter anterior (isso diferencia ambas as espécies de *Da. grandistomis*, em que não foi relatado por Thatcher 1979 nem observado no material tipo); sacos faríngeos extramurais; esôfago bem desenvolvido e presença de um bulbo esofágico; Os cecos terminam próximos ou não muito longe do acetábulo em ambos (mas muito curto em *Da. grandistomis*). O poro genital é bifurcal ou próximo à bifurcação. Ambos os testículos são diagonais, inteiros a ligeiramente lobados. O ovário não está entre as extremidades cecais como em *Da. grandistomis*, mas há alguma distância anterior a essa extremidade; o ovário está perto dos testículos em *Da. parauchenipteri*, mas longe deles em *Do. bacuense* e em *Da. grandistomis*. O útero é intercecal em *Da. grandistomis*, mas invade o lado do ceco em *Da. parauchenipteri* e *Do. bacuensis*; Os folículos vitelínicos de *Da. grandistomis* estão agrupados nas extremidades cecais; Em *Da. parauchenipteri*, são claramente anteriores às extremidades cecais, próximas do ovário, em campos mais ou menos horizontais. Em *Do. bacuense*, eles estão na zona ovariana e claramente anteriores às extremidades cecais como em *Da.*

parauchenipteri, mas em campos longitudinais. Um entalhe acetabular póstero-medial está presente em *Da. parauchenipteri* e *Do. bacuense*, mas não em *Da. grandistomis*.

As indicações são de que os caracteres morfológicos *Da. parauchenipteri* e *Do. bacuense* têm mais em comum entre si do que com *Da. grandistomis*. As diferenças entre os dois são a posição do ovário em relação aos testículos e a configuração - horizontal ou longitudinal - dos campos vitelinos. Essas diferenças seriam suficientes para separá-las em nível de espécie em termos morfológicos (a menos que pudessem ser mostradas como artefatos relacionados à fixação ou à maturidade).

Sequências de DNA estão disponíveis para *Da. parauchenipteri* e *Do. bacuensis*, que são muito próximas por vários critérios, mas não para *Da. grandistomis*, a espécie tipo de *Dadaytremoides*, que difere de ambas por vários caracteres morfológicos. Um gênero se apoia sobre sua espécie tipo, não em outras atribuídas a ele, e *Da. grandistomis* difere das outras na combinação de caracteres listados acima. Portanto, a atribuição de *D. parauchenipteri* para *Dadaytremoides* é pouco segura em termos morfológicos e as espécies devem ser transferidas para *Doradamphistoma* como uma nova combinação. Isso se encaixa com os resultados da análise molecular para ambas espécies do gênero (figuras 7 e 9). Apesar de ambos gêneros serem morfológicamente similares, o que resultou que ambos ficassem na mesma prancha na chave de Jones (2005b), eles não foram sinonimizados por conta da ausência de qualquer análise molecular da espécie-tipo de *Dadaytremoides* e dos caracteres morfológicos discutidos acima.

***Myleustrema concavatum* Thatcher & Jégu, 1998**

Figura. 5 A

Material estudado: série tipo (veja abaixo); um espécime de *Myloplus rubripinnis* (BRXJ 77 - D-799/1), rio Xingu em Altamira, Pará, Brasil, 19/07/ 2016, coletado por J. Carneiro. Hospedeiro tipo: *Myleus ternetzi* (Norman) (Characiformes: Serrasalmidæ).

Localidade tipo: Guiana Francesa.

Série tipo: Holótipo INPA 206, parátipos INPA 207a – d.

Hospedeiro adicional: *Myloplus rubripinnis** (Characiformes: Serrasalmidæ).

Sítio de infecção: intestino.

Parâmetros de infecção: *M. rubripinnis*: 1/3 (9).

Distribuição: Brasil (rio Xingu, Pará - nova localidade), Guiana Francesa.

Sequências de DNA representativas: não disponíveis.

Comentários: Os espécimes encontrados em *M. rubripinnis* são quase indistinguíveis daqueles descritos por Thatcher e Jégu (1998) como *M. concavatum*. A espécie foi descrita a partir de *M. ternetzi* na Guiana Francesa e nunca foi encontrada desde sua descrição original. É caracterizado por um saco do cirro de parede espessa, ovoide e a abertura do acetábulo dirigida posteriormente, com papilas minúsculas na sua borda. Além disso, tem um poro genital pós-bifurcal, faringe com longos sacos extramurais, testículos oblíquos lobulados muito mais largos que longos, e campos laterais curtos de folículos vitelínicos que se iniciam posteriormente no nível do ovário, mas não alcançando o nível do testículo posterior. A única diferença entre nossos espécimes e os de Thatcher e Jégu (1998) é que os cecos são visivelmente mais sinuosos no plano dorsoventral. A observação de MEV revelou círculos horizontais de papilas ao redor da extremidade anterior, sendo as papilas nos cinco primeiros círculos mais visíveis. Numerosas papilas também foram observadas no acetábulo, como mencionado na descrição original (Thatcher e Jégu, 1998).

Subfamília Kalitrematinae Travassos, 1933

Betamphistoma jariense Thatcher & Jégu, 1996

Material estudado: série tipo (veja abaixo); cinco espécimes coletados em *Tometes kranponhah* Andrade, Jégu & Giarrizzo (PAX 42), rio Xingu em Altamira, Pará, Brasil, 17.07. 2016, coletado por J. Moreira e M.C. Moraes (IPCAS D-800/1).

Hospedeiro tipo: *Mylesinus paraschomburgkii* (Characiformes: Serrasalminidae).

Localidade tipo: Rio Jarí, Pará, Brasil.

Série tipo: Holótipo INPA 187, parátipos INPA 188a – f.

Sítio de infecção: intestino.

Parâmetros de infecção: 1/2 (10).

Hospedeiro adicional: *Tometes kranponhah** (Characiformes: Serrasalminidae).

Distribuição: Brasil (rio Xingu, Pará - nova localidade).

Sequências de DNA representativas: indisponíveis.

Comentários: *Betamphistoma jariense* foi descrito de *M. paraschomburgkii* por Thatcher e Jégu (1996) como o tipo e única espécie de *Betamphistoma* Thatcher & Jégu, 1996. Cladorquídeos coletados no presente estado na mesma região (estado do Pará) correspondem a *B. jariensis* na maioria das características morfológicas, como por exemplo, corpo achatado, ceco curto, saco do cirro grande e de paredes espessas, poro genital pós-bifurcal esférico, pequeno bulbo esofágico e folículos vitelínicos limitados em extensão (ver Thatcher e Jégu 1996).

Pseudocladorchis sp.

Figura 5. B-D

Descrição baseada em sete espécimes – medidas dos espécimes a partir de hospedeiros diferentes estão na tabela 3.

Corpo subcilíndrico, ligeiramente afilado em cada extremidade. O acetábulo não possui um entalhe pósteromedial na borda dorsal. Abertura oral terminal. Papilas tegumentares em forma de cúpula presentes em torno da abertura oral e na extremidade anterior até o nível da faringe. Faringe com esfíncteres anterior e posterior e pequenos sacos intramurais primários pareados. Esôfago razoavelmente reto ou ligeiramente flexionado; bulbo esofágico ou espessamento não claramente observado. Bifurcação cecal no terço anterior do corpo. Cecos terminam próximo ao acetábulo. Testículos simétricos ou subassimétricos, irregulares, geralmente cobrem o ceco. Saco do cirro oval contém vesícula seminal interna e células prostáticas, logo após a bifurcação cecal. Poro genital bifurcal, rodeado por tecido glandular. Ovário entre extremidades cecais, subsférico, tão grande quanto ou, geralmente, maior que os testículos. Canal de Laurer não observado. Folículos vitelínicos em campos laterais ao longo do ceco, a partir do nível do ovário, mas sem atingir o nível dos testículos anteriormente; ductos vitelínicos transversais ocasionalmente visíveis como alça posterior ao ovário. Glândula de Mehlis pósteroventral ao ovário. O útero forma uma alça descendente; e a alça ascendente atravessa o ceco a partir da zona pós-ovariana até o nível bifurcal. Ovos numerosos. Vesícula excretora e poro não observados.

Hospedeiros: *Megalodoras uranoscopus*, *Pterodoras granulosus* e *Oxydoras niger* (Siluriformes: Doradidae); *Brachyplatystoma vaillantii*, *Calophysus macropterus* (Siluriformes: Pimelodidae).

Localidades: Iquitos, Região de Loreto, Peru (bacia do rio Amazonas) e Brasil (estado do Pará - rio Xingu).

Sítio de infecção: intestino.

Parâmetros de infecção: *B. vaillantii*: 1/1 (7); *C. macropterus*: 1/35 (1); *P. granulosus*: 18/32 (2; max 3); *O. niger*: 1/18 (3); *Megalodoras uranoscopus*: 1/2 (1).

Sequências de DNA representativas: 28S rDNA e *cox1* mtDNA.

Material estudado: um espécime coletado em *P. granulosus* (PI 350a), Iquitos, Peru, coletado em 09/09/2006 (IPCAS D-801/1); um espécime de *P. granulosus* (PI 441a), Iquitos, Peru, 15/09/2006 (IPCAS D-801/1); um espécime de *O. niger* (PI 223a), Iquitos, Peru, 19/04/2005 (IPCAS D-801/4).

Diagnose diferencial: A nova espécie é morfologicamente muito semelhante à *Pseudocladorchis nephrodorchis* (veja abaixo). Em *P. nephrodorchis*, os testículos têm uma forma exagerada de rim distinta, com os seus lobos finais normalmente orientados para a superfície ventral. Além disso, o ovário nos presentes espécimes é quase sempre igual em ralação ao tamanho ou maior que os testículos. Eles também diferem de *P. cylindricus* nesses aspectos e na falta de um entalhe póstero-medial no acetábulo. Essas diferenças são consideradas suficientes para designar uma nova espécie. Os dados moleculares também confirmam a validade (figura 7).

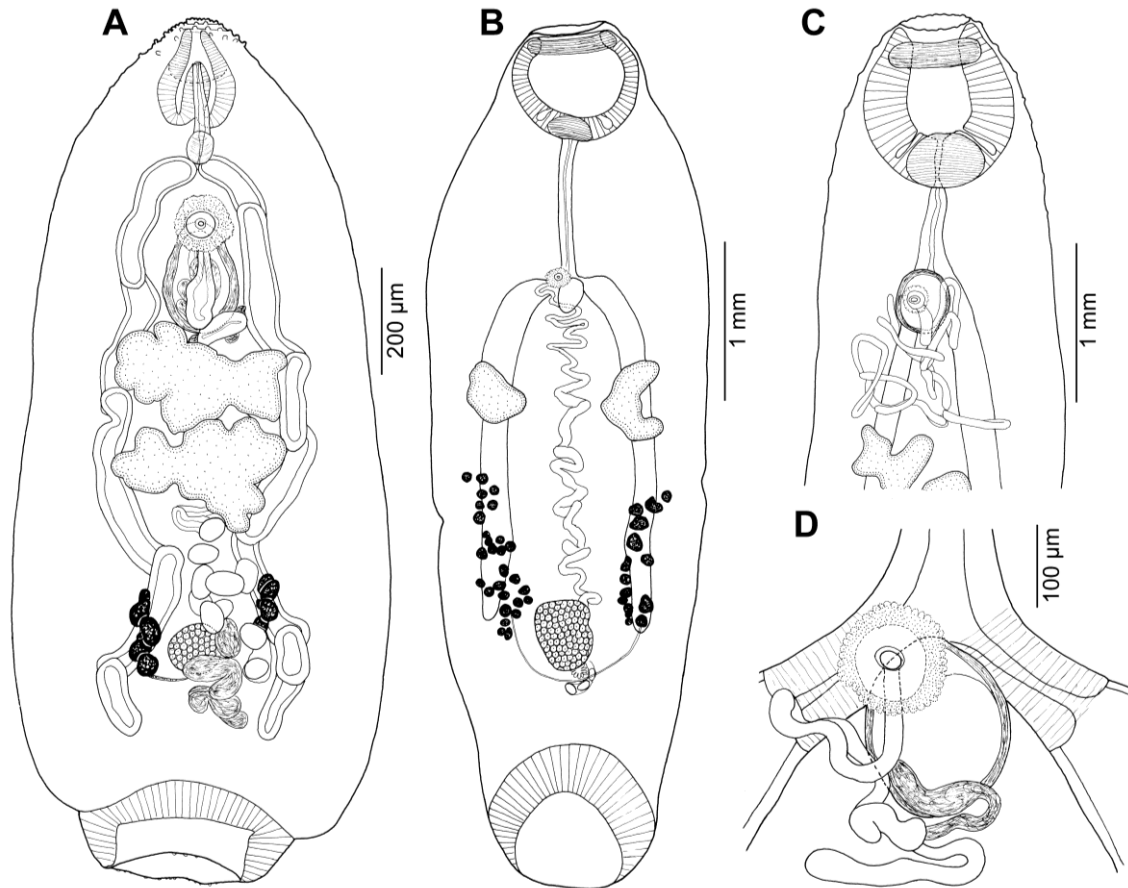


Figura 5. *Myleustrema concavatum* coletado em *Myloplus rubripinnis* (Müller & Troschel), Brasil. **A** – vista ventral. **B–D** – *Pseudocladorchis* sp. coletado em *Pterodoras granulosus* (Valenciennes), Peru (B, D) e *Oxydoras niger* (Valenciennes), Peru (C). **B** – vista ventral (IPCAS D-801/1); **C** – extremidade anterior com poro genital, vista ventral (IPCAS D-801/4); **D** – genitália terminal (IPCAS D-801/1).

Tabela 3. Medidas (em micrômetros) de *Pseudocladorchis* sp. em diferentes hospedeiros coletados no Peru.

Hospedeiro	<i>Pterodoras granulosus</i>	<i>Calophysus macropterus</i>	<i>Oxydoras niger</i>
Nº coleção	IPCAS D-801/1	IPCAS D-801/3	IPCAS D-801/4
Espécimes	5	1 (imaturo)	1
Comp total (mm)	5.02–8.21 (6.60)	1.08	5.74
Largura máxima (mm)	1.68–2.88 (2.35)	0.32	1.57
Comp acetábulo	752–1,463 (1,124)	222	1,038
Largura acetábulo	876–1,524 (1,298)	268	1,064
Comp faringe	634–777 (714)	292	955
Largura faringe	629–988 (838)	243	927
Esôfago	798 –1.473 (1.166)	109	540
Bulbo esofágico	156–198	-	-
Bifurcação cecal até extremidade anterior (mm)	1.09–2.00 (1.50)	0.87	2.88
Ceco (direito) (mm)	2.35–4.74 (3.18)	0.37	2,69
Ceco (esquerdo) (mm)	2.35–4.72 (3.21)	0.36	2,81
Comp testículo anterior	162–421 (344)	181	181
Largura testículo anterior	201 –544 (350)	459	459
Comp testículo posterior	187–619 (388)	424	424
Largura testículo posterior	208–506 (341)	254	254
Comp ovário	174–427 (342)	35	342
Largura ovário	123 –669 (320)	61	320

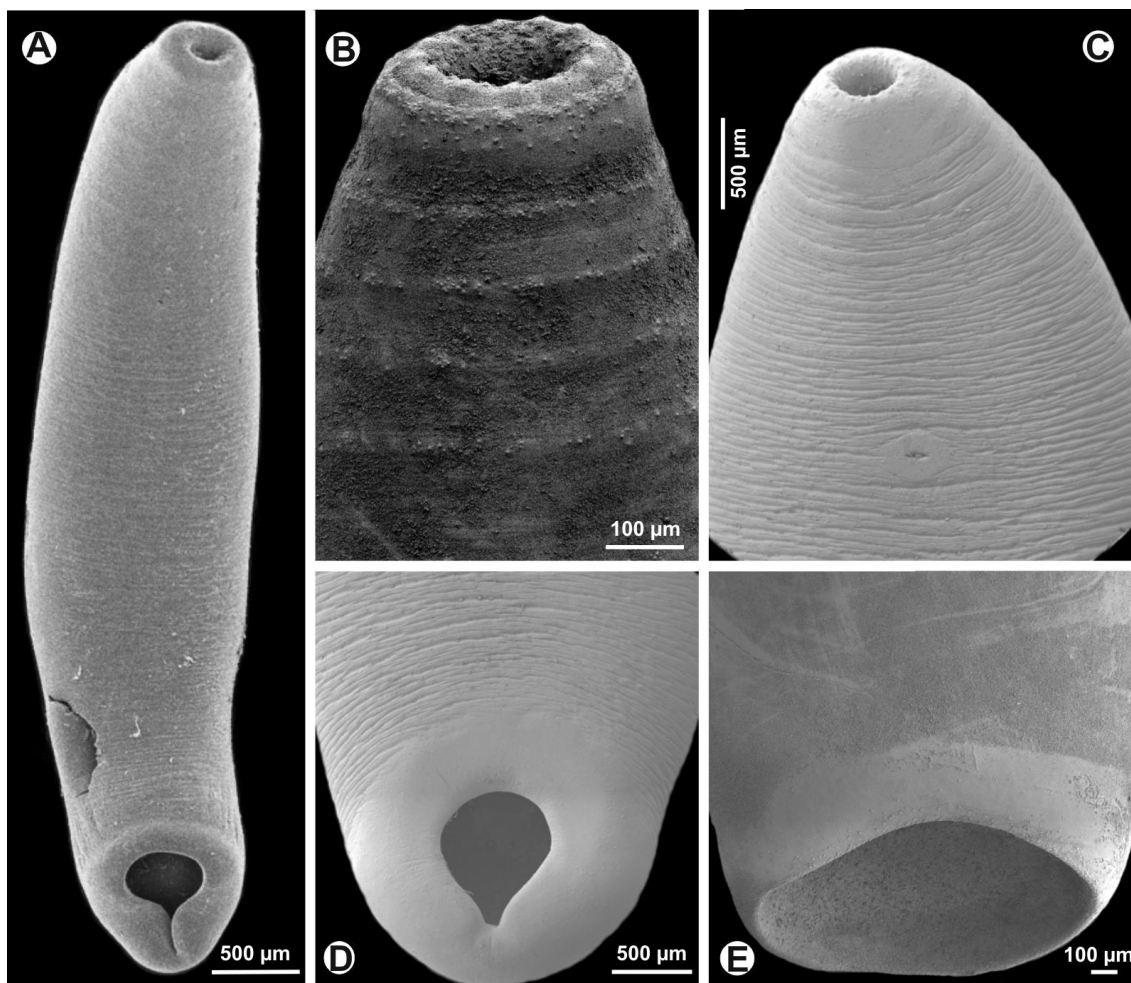


Figura 6. Micrografias (MEV) de *Doradamphistoma parauchenipteri* (Lunaschi, 1989) comb. n. coletado em *Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus), Brasil (A–B), *Doradamphistoma bacuense* em *Megalodoras uranoscopus* (Eigenmann & Eigenmann), Brasil (C–D) e *Pseudocladorchis* sp. em *Pterodoras granulatus* (Valenciennes), Peru (E). A – vista ventral; B – extremidade anterior mostrando a distribuição das papilas; C – parte anterior, abertura oral e poro genital; D – entalhe posterior do acetábulo; E – acetábulo; ausência de entalhe posterior.

***Pseudocladorchis nephrodorchis* Daday, 1907**

Material estudado: Um espécime coletado em *Leporinus affinis* Günther (PAX 20), rio Xingu em Altamira, Pará, Brasil, 23.09.2013, coletado por F.B. Pereira e P.V. Alves (IPCAS D-802/1); um espécime de *Metynnus lippincotianus* (PAIA 06f), Rio Maracanã, Igarapé-açu, Pará, Brasil, 13/07/2016, coletado por C. Pantoja; um espécime em *Myleus setiger* (PAX 67); dois espécimes em *Myloplus rubriipinis* (BRXJ73; PAX 44, 54 - IPCAS D-802/2); dois espécimes em *Myloplus schomburgkii* (Jardine) (BRXJ 71, PAX 92); um espécime em *Serrasalmus manuelei* (Fernández-Yépez & Ramírez) (PAX 61 - IPCAS D-802/4); quatro espécimes em *Tometes kramponhah* (BRXJ 05, PAX 42 - IPCAS D-802/5); dois espécimes em *Ossubtus xinguense* Jégu (BRXJ 01 - IPCAS D-

802/3), todos do rio Xingu em Altamira, Pará, Brasil, 20/07/2016, coletados por J. Carneiro, J. Moreira e M.C. Moraes

Hospedeiro tipo: Não designado por Daday (1907) que mencionou três hospedeiros de peixes: *Salmo* sp., *Salmo pacu* (= *Piaractus brachypomus* Cuvier) e *Salmo pampa* (= *Mylossoma aureum* (Spix & Agassiz)).

Localidade tipo: Não mencionado explicitamente, mas muito provavelmente Paraná ou Rio Paraguai, Mato Grosso, Brasil (com base nos dados de Diesing, 1836).

Série tipo: Museu de História Natural em Viena, lâmina 980.

Hospedeiros adicionais: *Leporinus affinis** (Characiformes: Anostomidae), *Metynnis lippincotianus**, *Myleus setiger**, *Myloplus rubripinnis**, *Myloplus schomburgkii**, *Serrasalmus manueli**, *Tometes kranponhah** e *Ossubtus xinguense* (Characiformes: Serrasalmidae).

Distribuição: Brasil (estados do Paraná ou Mato Grosso; Rio Marapanim, Igarapé-açu, Pará - nova localidade; Rio Xingu em Altamira, Pará - nova localidade).

Sítio de infecção: intestino.

Parâmetros de infecção: *L. affinis*: 1/3 (2); *M. lippincotianus*: 1/16 (1); *M. setiger*: 1/6 (2); *M. rubripinnis*: 2/7 (1); *M. schomburgkii*: 2/6 (3); *S. manueli*: 1/4 (2); *T. kramponhah*: 2/3 (4); *O. xinguense*: 1/1 (2).

Sequências DNA representativas: 28S rDNA

Comentários: Espécimes encontrados em várias espécies de peixes serrasalmídeos são colocados em *Pseudocladorchis* Daday, 1907, porque eles possuem características típicas do gênero (ver Jones 2005b), por exemplo, uma grande faringe com esfíncteres anteriores e posteriores e sacos faríngeos intramurais, testículos simétricos ou quase, cobrindo os cecos ventralmente, folículos vitelínicos em campos laterais restritos desde o nível testicular até perto ou além das extremidades dos cecos e um poro genital bifurcal.

O gênero foi proposto por Daday (1907) para acomodar três espécies coletadas por J. Natterer no Brasil e então descritas por Diesing (1836), *Amphistoma cylindricum* Diesing, 1836 (listadas primeiro e, portanto, consideradas a espécie-tipo; ver Jones 2005b), *Pseudocladorchis nephrodorchis* Daday, 1907 e *Pseudocladorchis macrostomus* Daday, 1907. Embora Daday (1907) fornecesse descrições morfológicas detalhadas de todas as três espécies, não havia de fato um diagnóstico diferencial explícito. Como indicado pelo nome da espécie, *P. nephrodorchis* tem testículos de uma forma reniforme distinta, que difere significativamente dos testículos das outras espécies. Stunkard (1925) sinonimou todas as três espécies com *P. cylindricus*, porque não considerou as diferenças entre *P. cylindricus*, *P. nephrodorchis* e *P. macrostomus* como significativas ao nível das espécies.

A comparação do texto original de Daday (1907) e suas figuras nas pranchas 25 e 26 revelaram que *P. cylindricus* (Diesing, 1836) (figuras 7 e 9) e *P. macrostomus* Daday, 1907 (figura 8) possuem um entalhe póstero-medial na borda posterior do acetábulo.

Em contraste, *P. nephrodorchis* tem um acetábulo sem um entalhe póstero-medial (prancha 25, figuras 18, 20; prancha 26, figura 1). Com base nesta diferença, *P. macrostomus* é retido como um sinônimo júnior de *P. cylindricus* como proposto inicialmente por Stunkard (1925), mas *P. nephrodorchis* é considerada espécie válida. A descrição de *P. nephrodorchis* foi baseada em espécimes de Diesing (1836) designados como *Amphistomum oxycephalum* nos slides nº 980 (de '*Salmo* sp. '), 981 (de *Salmo pacu* = *Myletes bidens*) e 983 (*Salmo pampa* = *Myletes aureus*).

O acetábulo dos espécimes coletados neste estudo não possui o entalhe póstero-medial típico de *P. cylindricus*. Portanto, eles são indistinguíveis de *P. nephrodorchis*

(ver acima) a este respeito. Além disso, os espécimes que não possuem esse caráter também têm testículos reniformes, conforme indicado pela escolha de Daday (1907) do nome da espécie.

Relações filogenéticas de trematódeos cladorquídeos de peixes de água doce

Um total de 66 sequências de três marcadores moleculares de 39 isolados de 26 hospedeiros foi obtido (Tabela 1). As árvores filogenéticas de 28S rDNA e ITS2 rDNA apresentaram a mesma topologia, apesar da análise de 28S rDNA incluir mais táxons (figuras 7 e 9). A árvore filogenética com dados de *cox1* mtDNA foi gerada sem raiz porque a distância nucleotídica do grupo externo mais próximo era grande, sendo assim, não foi possível testar relações confiáveis entre os cladorquídeos (Figura 8). Os dados moleculares revelaram que os cladorquídeos formam um grupo monofilético, enquanto as subfamílias Dadayiinae e Kalitrematinae se revelaram de forma oposta, duas espécies de Kalitrematinae pertencem a duas linhagens distintas (Figura 7).

Várias linhagens bem suportadas podem ser distinguidas com base em dados moleculares, especialmente o conjunto de dados baseado em sequências de 28S rDNA (ver figura 7 para designação de clados individuais). O clado A compreende três espécies morfológicamente similares, mas geneticamente distintas de *Dadaytrema*, que formam um grupo monofilético. O clado B inclui duas espécies morfológicamente similares de *Pseudocladorchis*, que diferem uma da outra por uma divergência de nucleotídeo em torno de 1% (dados 28S rDNA). Essas espécies também divergem na ocorrência de hospedeiros: *P. nephrodorchis* ocorre em peixes Characiformes, enquanto *Pseudocladorchis* sp. foi encontrado apenas em peixes Siluriformes.

Dois amostras para as quais os hologenóforos necessários para sua identificação não estavam disponíveis foram sequenciadas (28S rDNA). Elas aparecem em linhagens distintas e estão provisoriamente designadas como Cladorchiidae gen. sp. 1 (clado C) e Cladorchiidae gen. sp. 2 (clado G).

Dois clados D e E bem suportados e intimamente relacionados compreendem espécies de dois gêneros monotípicos, morfológicamente bastante semelhantes, *Doradamphistoma bacuensis* e *Dadaytrematoides parauchenipteri*, ambos parasitando bagres (doradídeos na primeira espécie e auchenipterídeos e pimelodídeos na segunda). Dados moleculares indicam que essas espécies são congêneras, suportando a combinação proposta para *Dadaytrematoides parauchenipteri* baseado em características morfológicas (ver acima). A divergência nucleotídica entre espécimes de ambas espécies é baixa (apenas 2% em análise de 28S rDNA), correspondendo a diferenças entre espécies do mesmo gênero.

Outro clado bem suportado denominado F (figura 8) é composto por *Iquitostrema papillatum* e *Goeldamphistoma amazonum*, duas espécies recentemente descritas da Amazônia peruana. A divergência nucleotídica entre essas duas espécies morfológicamente bem distintas é baixa (somente de 2% em análise de 28S rDNA, enquanto divergência entre espécies de *Dadaytrema* variou entre 2-4%)

O clado H é um clado irmão de todos os cladorquídeos neotropicais, que formam uma monofilia. Este clado é composto por três cladorquídeos não neotropicais, *Amurotrema dombrovskajae* da região paleártica, *Helostomatis* cf. *helostomatis* da região indo-malaia e *Pisciamphistoma stunkardii* da região neártica. A última espécie de centrarquídeos norte-americanos é irmã do clado que contém os dois táxons do Velho Mundo.

O clado H é um clado-irmão de todos os cladorchiids neotropicais (clades A-G), que formam uma assembléia monofilética.

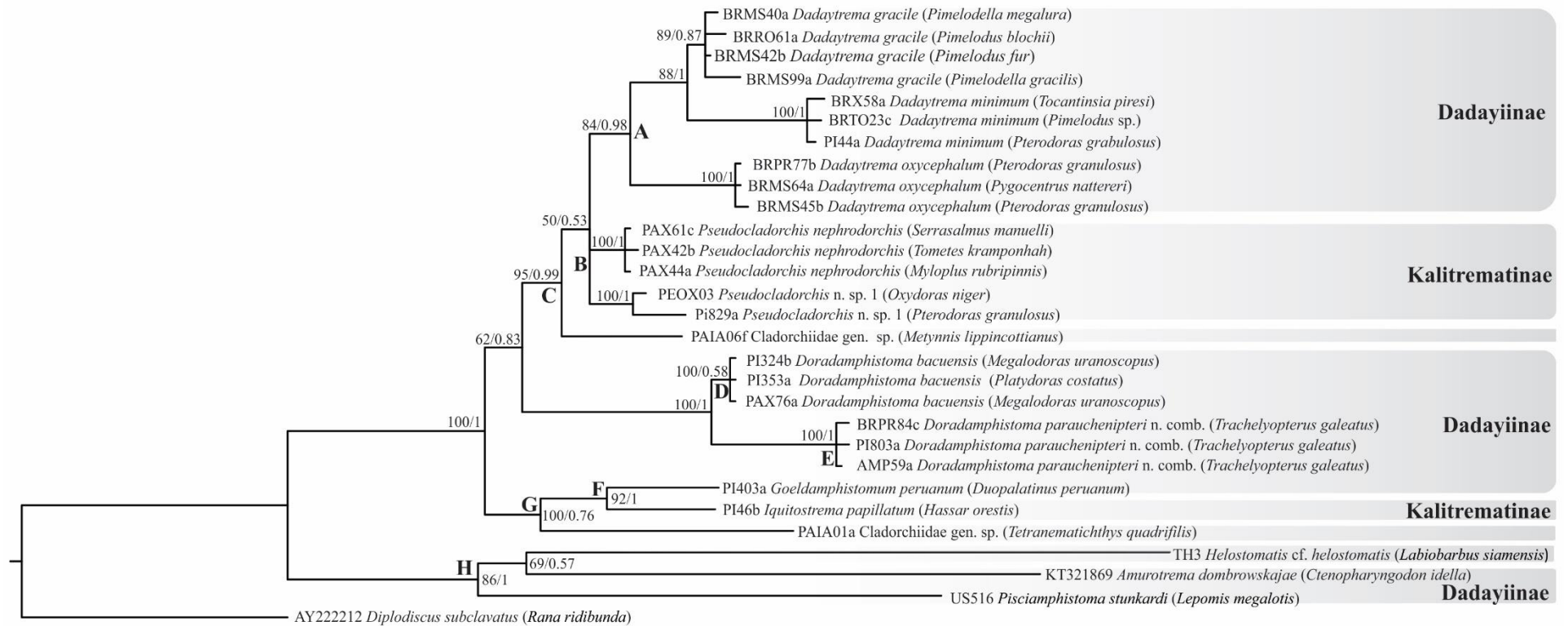


Figura 7. Árvore bayesiana da análise filogenética de 28S rDNA de cladorquídeos parasitos de peixes dulcícolas no Brasil e no Peru. O primeiro número mostra os valores de bootstrap (ML – 1.000 replicações); o segundo número representa o suporte dos ramos pela probabilidade posterior (4×10^6 generations; burn-in = 4×10^3). *Diplodiscus subclavatus* foi usado como grupo externo.

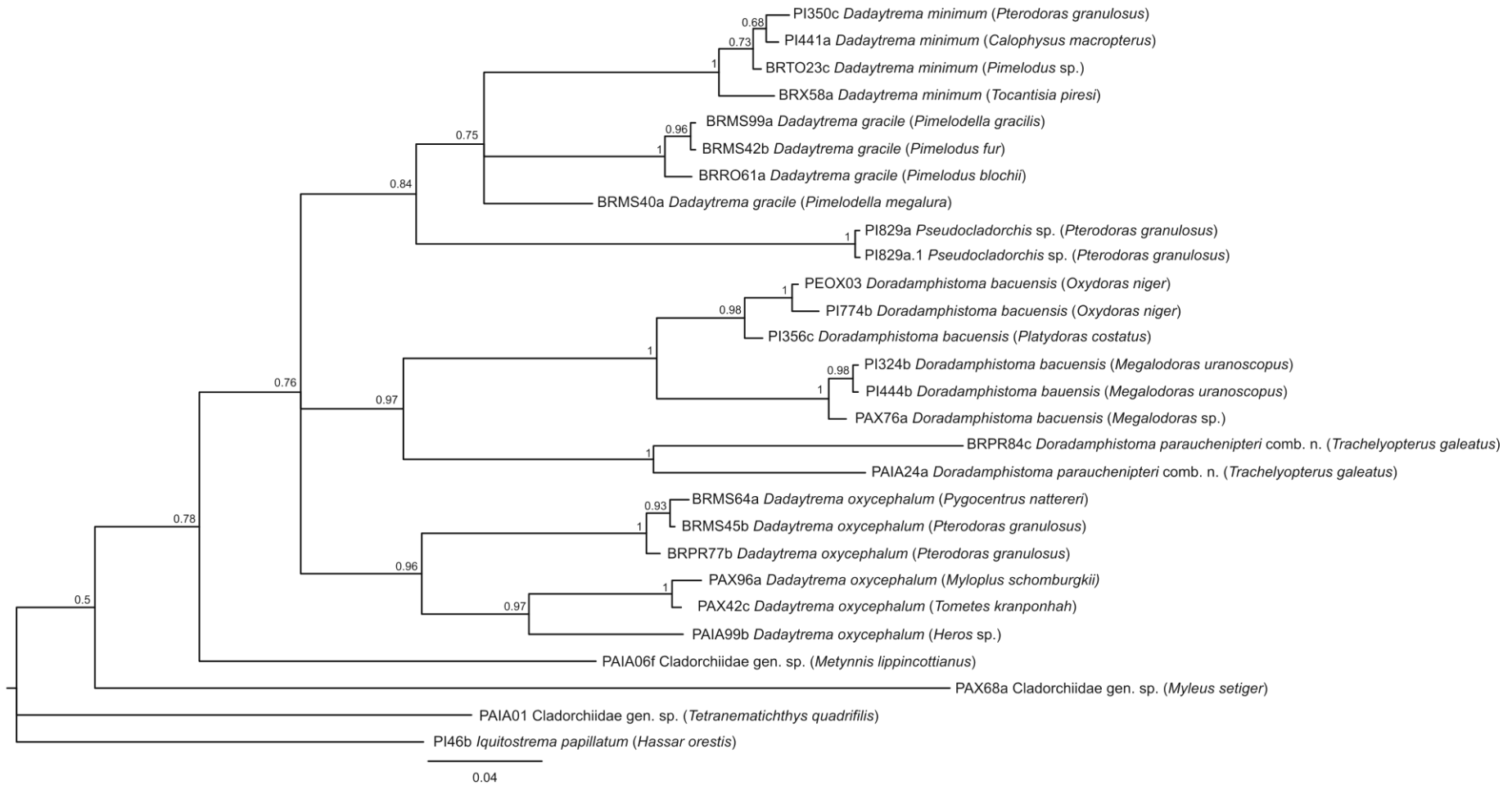


Figura 8. Árvore bayesiana da análise filogenética das sequências de *cox1* mtDNA de cladorquídeos parasitos de peixes dulcícolas do Brasil e Peru. O número representa o suporte dos ramos pela probabilidade posterior (4×10^6 generations; burn-in = 4×10^3). A árvore foi construída sem grupo externo.

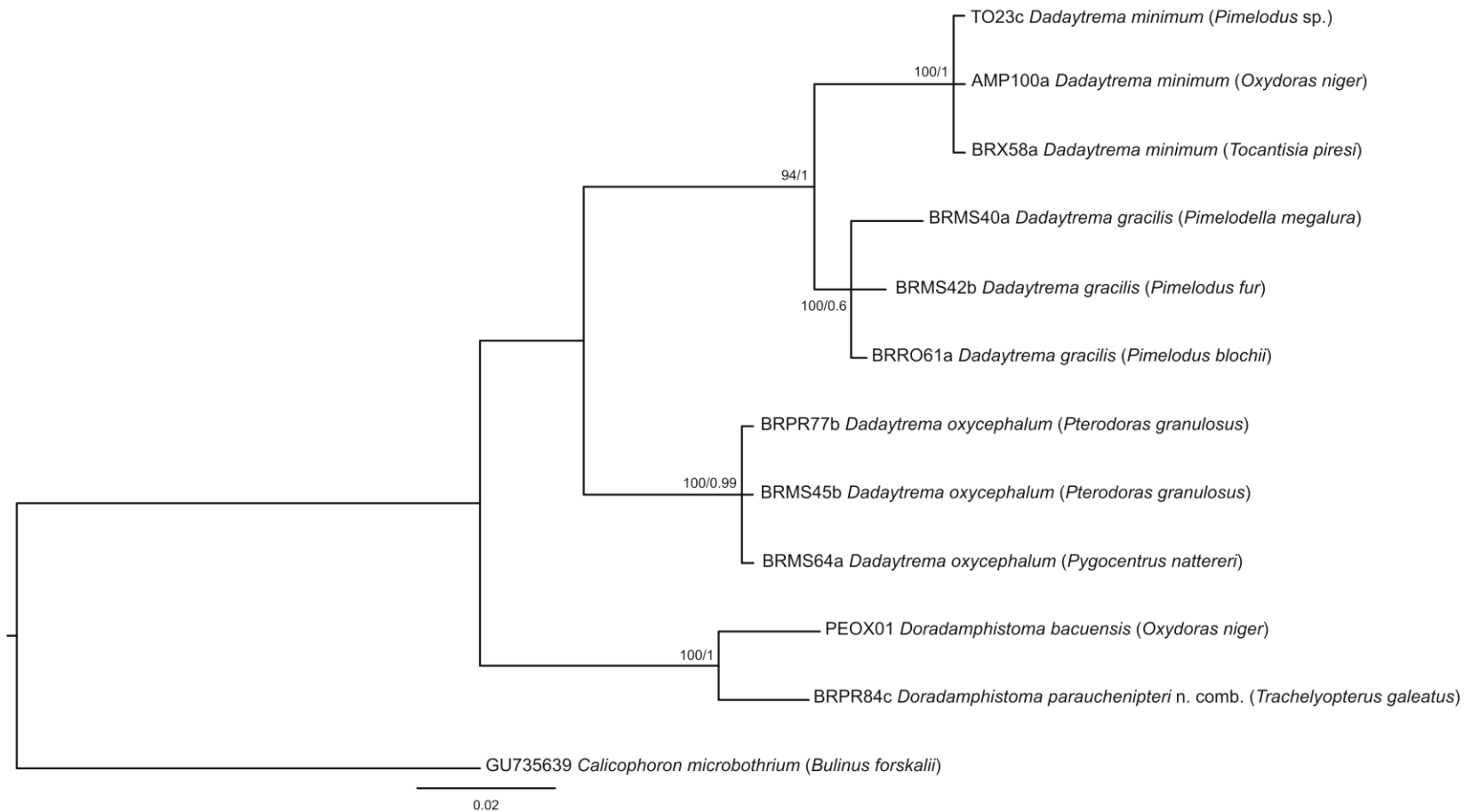


Figura 9. Árvore bayesiana da análise filogenética de ITS2 rDNA de cladorquídeos parasitos de peixes dulcícolas no Brasil e no Peru. O primeiro número mostra os valores de bootstrap (ML – 1.000 replicações); o segundo número representa o suporte dos ramos pela probabilidade posterior (4×10^6 generations; burn-in = 4×10^3). *Calicophoron microbothrium* foi usado como grupo externo.

4. Discussão

O presente estudo fornece uma lista de 15 espécies de trematódeos cladorquídeos encontrados em peixes de água doce na América do Sul (Brasil e Peru), com numerosos novos registros de hospedeiros (29) e geográficos (8). Além disso, três novas espécies são propostas e fotos de microscopia eletrônica de varredura de sete espécies foram fornecidas, sendo cinco pela primeira vez. No entanto, a novidade mais importante do presente estudo é a primeira avaliação das relações filogenéticas dos cladorquídeos neotropicais.

No mais abrangente estudo filogenético molecular de digenéticos em nível de família, Olson et al. (2003) incluiu apenas duas espécies da superfamília Paramphistomoidea, *Solenorchis travassosi* Hilmy, 1949 (Cladorchiidae) parasito de *Dugongo dugon* (Muller, 1776), na Austrália e *Diplodiscus subclavatus* (Pallas, 1760) (Diplodiscidae) parasito de *Rana ridibunda* Palla, 1771 na Bulgária. Mais recentemente, as inter-relações de paramphistomes foram feitas usando dados moleculares, mas apenas um único cladorquídeo parasito de peixe, *Amurotrema dombrowskajae* Achmerow, 1959, da carpa *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes), na região paleártica foi incluído (SOKOLOV et al., 2016).

O presente estudo revelou Cladorchiidae como uma família monofilética, enquanto duas de suas subfamílias, Dadayiinae e Kalitrematinae, apareceram como não-monofiléticas. No entanto, dados moleculares para membros de outras subfamílias de trematódeos cladorquídeos são necessários antes que qualquer nova proposta na classificação de subfamília. A mesma preocupação diz respeito à validade de alguns gêneros morfologicamente bem distintos, mas estreitamente relacionados em nível molecular, onde a divergência de nucleotídeos entre eles aparece igual ou inferior à divergência entre espécimes do mesmo gênero.

Usando dados moleculares, foi possível distinguir espécies morfologicamente similares, como *Pseudocladorchis nephrodorchis* e *Pseudocladorchis* sp. e as três espécies de *Dadaytrema*. Em contraste, algumas espécies morfologicamente distintas de gêneros diferentes aparecem estarem intimamente relacionadas, como exemplo, *Goeldamphistoma peruanum* e *Iquitostrema papillatum*. Eles são visivelmente diferentes uma do outra, por exemplo, diferem na posição dos testículos e na distribuição do útero, na distribuição dos folículos vitelínicos e no tipo do acetábulo (ver PANTOJA et al., 2018). Alguns estudos anteriores sobre paramphistomes também revelaram que 28S rDNA pode não ajudar a diferenciar as espécies aparentadas (HWANG; KIM, 1999; GHATANI et al. 2014).

Os cladorquídeos neotropicais aparecem como monofiléticos, com três cladorquídeos não neotropicais, *Amurotrema dombrowskajae* da Rússia, *Helostomatis* cf. *helostomatis* da Tailândia e *Pisciamphistoma stunkardii* dos EUA, que se apresentam em um clado irmão. A primeira espécie é nativa do Extremo Oriente da Rússia e foi introduzida com carpas na Ásia Central, Leste e Europa Central (CHEN 1985; SOKOLOV et al. 2016). Esta espécie está mais relacionada com *H.* cf. *helostomatis* da região Indomalayan, e ambas são irmãs de *P. stunkardii* da região neártica. Manter (1963) assumiu que este parasito de centrarquídeos na América do Norte não está intimamente relacionado com cladorquídeos do Brasil, tendo se originado de um ancestral marinho.

McClelland (1957) observou semelhança morfológica entre espécies de *Brevicaecum* McClelland, 1957 (africana) e *Kalitrema* Travassos, 1933 (sul-americana), sugerindo que a diferença na distribuição geográfica é provavelmente insignificante. Além disso, os cladorquídeos da América do Sul e da África compartilham hospedeiros

similares (peixes Siluriformes e Characiformes) (MANTER 1963; JONES 2005b; THATCHER 2006). Infelizmente, os dados moleculares não estão disponíveis para qualquer cladorquídeo africano de peixes dulcícolas para ter uma melhor visão sobre a história evolutiva do grupo.

No geral, os dados moleculares revelam uma especificidade de hospedeiro menos restrita da maioria das espécies porque as mesmas espécies de trematódeos ocorreram em peixes de diferentes espécies, gêneros, famílias ou mesmo ordens (Characiformes e Siluriformes). Por exemplo, *Dadayius marenzelleri* ocorre em auchenipterídeos e serrasalmídeos, *Dadaytrema minimum* em auchenipterídeos, doradídeos, pimelodídeos e serrasalmídeos, e *D. oxycephalum* em três famílias de Siluriformes e duas famílias de Characiformes. Dados moleculares também confirmaram a ampla área de distribuição de algumas espécies que ocorrem nas duas principais bacias hidrográficas da América do Sul, ou seja, as bacias dos rios Amazonas e Paraná (três espécies de *Dadaytrema* e *Dadaytremoides parauchenipteri*).

A maioria dos cladorquídeos de peixes de água doce da América do Sul ocorre em peixes Characiformes, mas o extenso material coletado no Brasil e no Peru neste estudo se concentrou em Siluriformes, com o maior número de espécies (e a maior intensidade de infecção) encontradas em doradídeos. O número de cladorquídeos encontrados em auchenipterídeos e pimelodídeos foi consideravelmente menor e muito poucos trematódeos ocorreram em ciclídeos, mas os espécimes encontrados em *Heros* sp. representou uma nova espécie. Apesar da extensa pesquisa de V.E Thatcher na Amazônia brasileira nas duas últimas décadas do século 20, esse grupo de trematódeos de peixe ainda é pouco conhecido. É evidenciado por Pantoja et al., (2018) que descreveu três novas espécies em dois novos gêneros baseados em material da Amazônia peruana, e um grande número de novos registros geográficos e hospedeiros aqui apresentados. A descrição de outras três novas espécies no presente trabalho aumenta a diversidade total de cladorquídeos em peixes de água doce para 38 espécies na América do Sul, com dominância de táxons que ocorrem na região Neotropical (THATCHER 2006; CHOUDHURY et al. 2016; SCHOLZ et al. 2016).

5. Referências

ANDERSON G.R.; BARKER S.C. Inference of phylogeny and taxonomy within the Didymozoidae (Digenea) from the second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA. **Systematic Parasitology**, v. 41, n. 2, p. 87–94, 1998.

BOWLES J.; BLAIR D.; MCMANUS D. P. A molecular phylogeny of the human schistosomes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 4, n. 2, p. 103–109, 1995.

CHOUDHURY, A.; AGUIRRE-MACEDO, M. L.; CURRAN, S. S.; OSTROWSKI DE NUÑEZ, M., OVERSTREET, R. M.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; et al. Trematode diversity in freshwater fishes of the Globe II: ‘New World’. **Systematic Parasitology**, v. n. 93, p. 271–282, 2016.

DADAY, F. In Südamerikanischen Fischen lebend Trematoden-Arten. Zool. Jahrb., Abt. Syst., Geogr. Biol. Tiere 24: 469–590, 1907.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, p. 772–772, 2012.

DIESING, K.M. Monographie der Gattungen *Amphistoma* and *Diplodiscus*. **Annals Wiener Museums Naturgesch.** v. 1, p. 235–260, 1836.

EDUARDO, S.L. The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants I. General considerations. **Systematic Parasitology**, v. 4, p. 7–57, 1982a.

EDUARDO S.L. The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. II. Revision of the genus *Calicophoron* Näsmark, 1937 and elevation of the subgenus *Explanatum* Fukui, 1929 to full generic status. **Systematic Parasitology**, v. 6, p. 3–32, 1982b.

FROESE, R.; PAULY, D. (Eds). FishBase. **World Wide Web electronic publication**. Disponível em: www.fishbase.org, versão 10/2018.

HEYNEMAN, D.; BRENES, R. R.; DIAZ-UNGRÍA, C. Trematodos de Venezuela II. Algunos trematodos de peces, reptiles y aves con descripción de una nueva especie del género *Lubens*. **Memorial de la Sociedad de Ciencias Naturales de La Salle**, v. 20, p. 138–149, 1960.

JONES, A. Superfamily Paramphistomoidea Fiscoeder, 1901. In: A. Jones, R.A. Bray and D.I. Gibson (Eds.), Keys to the Trematoda. **CAB International & The Natural History Museum, Wallingford**, v. 2, p. 221–227, 2005a.

JONES A. Family Cladorchiidae Fiscoeder, 1901. In: A. Jones, R.A. Bray and D.I. Gibson (Eds.), Keys to the Trematoda. **CAB International & The Natural History Museum, Wallingford**, v 2, p. 257–317, 2005b.

KATOK, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 772–780, 2013.

KUCHTA, R.; CAIRA, J.N. Three new species of *Echinobothrium* (Cestoda: Diphyllidea) from Indo-Pacific stingrays of the genus *Pastinachus* (Rajiformes: Dasyatidae). **Folia Parasitologica**, v. 57, p. 185–196, 2010.

LACERDA, A. C. F.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. A new species of *Dadayius* Fukui, 1929 (Digenea: Cladorchiidae), parasite of the intestinal tract of *Metynniss maculatus* (Kner, 1858) (Characidae) from the upper Parana´ River floodplain. Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 283–285, 2003.

LAIDENITT, M.R.; ZAWADZKI, E.T.; BRANT, S.V.; MUTUKU M.W.; MKJI, G.M.; LOKER, E.S. Loads of trematodes: discovering hidden diversity of paramphistomoids in Kenyan ruminants. **Parasitology**, v. 144, n. 2, p. 131–147, 2017.

LOFTY, W.M.; BRANT, S.V.; ASHMAWY, K.I.; DEVKOTA, R.; MKOJI, G.M., LOKER, E.S. A molecular approach for identification of paramphistomes from Africa and Asia. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 3-4, p. 234–240, 2010.

LOPES, L. P. C.; KARLING L. C.; TAKEMOTO, R. M.; ROSSONI, F.; FERREIRA, E. J. G.; PAVANELLI, G. C. A new species of *Dadayius* Fukui, 1929 (Digenea: Cladorchiidae), parasite of *Symphysodon aequifasciatus* Pellegrin, 1904 (Perciformes: Cichlidae) from the Purus River, Amazon, Brazil. **Helminthologia**, v. 48, n. 3, p. 200–202, 2011.

LUNASCHI, L. I. Helminthos parasitos de peces de agua dulce de la Argentina VI. Sobre una nueva especie del genero *Microrchis* Daday, 1907 (Trematoda – Paramphistomidae). **Neotropica**, v. 33, n. 89, p. 37–40, 1987.

LUNASCHI, L. I. Helminthos parasitos de peces de agua dulce de la Argentina. VII. Acerca de dos nuevas especies de paranfistómidos (Trematoda – Paramphistomidae). **Neotropica**, v. 35, n. 93, p. 35–42, 1989.

LUTON, K.; WALKER, D.; BLAIR, D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda Digenea). **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 56, n. 2, p. 323–327, 1992.

MANTER H.W. The zoogeographical affinities of trematodes of South American freshwater fishes. **Systematic Zoology**, v. 12, n. 2, p. 45–70, 1963.

MARTÍNEZ-AQUINO, A.; CECCARELLI, F.S.; EGUIARTE, L.E.; VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E.; PÉREZ-PONCE DE LÉON, G. Do the historical biogeography and evolutionary history of the digenean *Margotrema* spp. across Central Mexico mirror those of their freshwater fish hosts (Goodeinae)? **PLoS ONE** 7: e101700, 2014.

MCCLELLAND, W. F. J. Two new genera of amphistomes from Sudanese freshwater fishes. **Journal of Helminthology**, v. 31, n. 4, p. 247–256, 1957.

NÄSMARK, K. E. A revision of the trematode family Paramphistomidae. **Zoologiska Bidrag Uppsala**, v. 16, p. 301–565, 1937.

OLSON, P. D.; CRIBB, T. H.; TKACH, V. V.; BRAY, R. A.; LITTLEWOOD, D. T. J. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). **International Journal of Parasitology**, v. 33, p. 733–755, 2003.

PANTOJA C.; SCHOLZ T.; LUQUE J.L.; JONES A. New genera and species of paramphistomes (Digenea: Paramphistomoidea: Cladorchiidae) parasitic in fishes from the Amazon basin in Peru. **Systematic Parasitology**, v. 95, n. 7, p. 611–624. 2018.

RAMBAUT A.; SUCHARD M. A.; XIE D.; DRUMMOND A. J. Tracer v1.6, World Wide Web electronic publication, <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>, 2014.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. Mr.Bayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012.

SANABRIA, R.; MORÉ, G.; ROMERO, J. Molecular characterization of the ITS2-2 fragment of *Paramphistomum leydeni* (Trematoda: Paramphistomidae). **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 182–185, 2011.

SEY, O. Scope of and proposal for systematics of the Amphistomida (Lühe, 1909) Odening, 1974. **Parasitologia Hungarica**, v. 21, p. 17–30, 1988,

SEY, O. CRC Handbook of the Zoology of Amphistomes. **CRC Press**, Boca Raton, Florida, 480 p, 1991.

SEY, O. Keys to the identification of the taxa of the amphistomes (Trematoda, Amphistomida). **Regional Centre of the Hungarian Academy of Sciences**, Veszprem (MTA VEAB)/ University of Pecs, Pecs, 120 p, 2005.

SOKOLOV, S. G.; LEBEDEVA, D. I.; KALMYKOV, A. P. Phylogenetic position of trematode *Amurotrema dombrovskajae* Achmerow, 1959 (Paramphistomoidea: Cladorchiidae) based on partial 28S rDNA nucleotide sequences. **Helminthologia**, v. 53, n. 2, p. 161–164, 2016.

STUNKARD, H. W. The present status of the amphistome problem. **Parasitology**, v. 17, n. 2, p. 137–148, 1925.

THATCHER, V.E. Paramphistornidae (Trematoda: Digenea) de peixes de agua doce: dois novos gêneros de Colombia e uma redescricao de *Dadaytrema oxycephala* (Diesing, 1936) Travassos, 1934 da Amazonia. **Acta Amazonica**, v. 9, n. 1, p. 203–208, 1979a.

THATCHER, V.E. Two new genera of Paramphistomidae (Trematoda, Digenea) from freshwater fish of Rondonia State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 1, p. 287–291, 1992a.

THATCHER, V. E. Surface morphology of some amphistomes (Trematoda) of Amazonian fishes and the description of a new genus and species. **Acta Amazonica**, v. 29, n. 4, p. 607–614, 1999.

THATCHER, V.E. Amazon Fish Parasites. Second edition. Aquatic Biodiversity in Latin America. **Pensoft, Sofia & Moscow**, v. 1, 508 p, 2006.

THATCHER, V.E.; JEGU, M. Intestinal helminths as population markers of the Amazonian fish *Mylesinus paraschomburgkdi*, with descriptions of five new genera and seven new species of trematodes. **Amazoniana**, v. 14, p. 143–156, 1996.

TKACH, V.; PAWLOWSKI, J.; MARIAUX, J. Phylogenetic analysis of the suborder Plagiorchiata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial 18S rDNA sequences. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 83–93, 2000.

UTUK, A.E.; PISKIN, F.C. Molecular detection and characterization of goat isolate of *Taenia hydatigena* in Turkey. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–4, 2012.

VAZ, Z. Contribuição ao conhecimento dos trematóides de peixes fluviais do Brasil. **Inaugural Dissertation**, São Paulo, 47 p, 1932.

VICENTE, J.J.; SANTOS, E.; SOUZA, S.V. Helminths of fishes from the northern fluminense – II. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 72, n. 3-4, p. 173–180, 1978.

YAMAGUTI, S. 1958: The Digenetic Trematodes of Vertebrates. Parts I & II. **Interscience Publishers**, New York & London, xi + 1575 p, 1958.

ZWICKL D.J. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. **Thesis: University of Texas, Austin**, 115 p, 2006.

Capítulo III

Posição filogenética de *Pseudosellacotyla lutzii* (Freitas, 1941) (Digenea: Cryptogonimidae), parasito de *Hoplias malabaricus* (Bloch) na América do Sul, através de sequencia de 28S rDNA e novas observações da ultraestrutura de seu tegumento¹

¹Artigo publicado: Pantoja, C. S.; Hernández-Mena, D. I.; De León, G. P.P.; Luque, J. L. 2018. Phylogenetic position of *Pseudosellacotyla lutzii* (Freitas, 1941) (Digenea: Cryptogonimidae), a parasite of *Hoplias malabaricus* (Bloch) in South America, through 28S rDNA sequences, and new observations of the ultrastructure of their tegument. **Journal of Parasitology** 104: 530–538 (Anexo II).

Resumo

O digenético *Pseudosellacotyla lutzii* (Freitas, 1941) Yamaguti, 1954 teve uma história taxonômica instável e foi classificado várias vezes como membro de diferentes famílias, Nanophyetidae, Heterophyidae, Microphallidae, Faustulidae e Cryptogonimidae. Nove espécimes individuais da traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), foram amostrados na bacia do rio Paraná, Paraná, Brasil; 22 espécimes de *P. lutzii* foram coletados. Um espécime foi usado para obter uma sequência de 28S rDNA, e para realizar uma análise filogenética para avaliar sua posição e classificação dentro de Plagiorchiida. A árvore resultante mostra inequivocamente que as espécies, juntamente com acanthostomines, pertencem à Cryptogonimidae, corroborando com achados recentes baseados na morfologia das cercárias e nas características do ciclo de vida. Além disso, o estudo da ultraestrutura das espículas tegumentares através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu caracterizá-los como espinhos pectinados, com projeções de 3 a 8 dígitos na extremidade distal e estendendo-se da extremidade anterior para a posterior do corpo. Este estudo também fornece os primeiros dados moleculares para um cryptogonimídeo na América do Sul.

Palavras-chave: MEV, morfologia, sistemática

Abstract

The freshwater fish digenean *Pseudosellacotyla lutzi* (Freitas, 1941) Yamaguti, 1954 has had an unsettled taxonomic history, and has at various times been classified as a member of Nanophyetidae, Heterophyidae, Microphallidae, Faustulidae, and Cryptogonimidae. Nine individual specimens of the trahira, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), were sampled in the Paraná River basin, Paraná State, Brazil; 22 specimens of *P. lutzi* were collected. One specimen of *P. lutzi* was used to obtain a sequence of the 28S rDNA, and to perform a phylogenetic analysis to assess their position and classification within Plagiorchiida. The resulting tree unequivocally shows that the species, along with acanthostomines belong to the Cryptogonimidae, corroborating recent findings based on the morphology of the cercariae, and in the characteristics of the life cycle. In addition, the study of the ultrastructure of the tegumental spines through scanning electron microscopy (SEM), allowed us to characterize them as pectinate spines possessing 3 to 8 digitiform projections at their distal end and extending from the anterior to the posterior extremity of the body. This study also provides the first molecular data for a cryptogonimid from South America.

Key-words: SEM, morphology, systematic

1. Introdução

A traíra é uma espécie predatória pertencente à família Erythrinidae (Characiformes) e possui, entre os peixes neotropicais dulcícolas, uma das mais amplas faixas de distribuição geográfica, ocorrendo desde a Costa Rica na América Central até Buenos Aires na Argentina (OYAKAWA, 2003; FROESE; PAULY, 2017).

O gênero monotípico *Pseudosellacotyla* foi proposto por Yamaguti, em 1954, para incluir *P. lutzii*, parasito dos cecos pilóricos e do intestino de *H. malabaricus* no Brasil. Após a publicação do registro original, *P. lutzii* foi relatado em vários estudos em uma ampla distribuição geográfica que inclui localidades na Argentina, Brasil e Colômbia (KOHN et al., 1985; KOHN; FERNANDES, 1987; FERNANDES; KOHN, 2001; TAKEMOTO et al., 2009; PÉREZ-CAICEDO et al., 2010; KOHN et al., 2011; QUINTANA; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2014).

Embora *P. lutzii* pareça ter alta especificidade de hospedeiro para *H. malabaricus*, Costa et al. (2015) relataram a presença deste digenético em *H. intermedius* (Günther). Esse resultado sugere que este cryptogonimid deve ser considerado como parte da fauna parasitária principal (sensu Pérez-Ponce de León e Choudhury, 2005) de *Hoplias* spp.

O ciclo de vida de *P. lutzii* foi elucidado experimentalmente por Quintana e Ostrowski de Núñez (2014), e inclui um caramujo thiarid como primeiro hospedeiro intermediário, um peixe tetragonopterídeo ou poecilídeo como segundo hospedeiro intermediário e *H. malabaricus* como hospedeiro definitivo.

A história taxonômica de *P. lutzii* tem sido controversa, uma vez que a espécie foi classificada como membro de várias famílias diferentes, com base em características morfológicas, como a forma do corpo piriforme, presença de espinhos no tegumento, ausência de gonotil e saco do cirro, e distribuição dos folículos vitelínicos. A espécie foi originalmente classificada por Freitas (1941) em Nanophyetidae Dollfus, 1939, mais tarde, foi incluído em Heterophyidae Leiper, 1909 por Yamaguti (1954), depois em Microphallidae, 1901 por Yamaguti (1958, 1971) e em Faustulidae Poche, 1926 por Bray (2008). No entanto, a caracterização morfológica de todas as fases do ciclo de vida de *P. lutzii* permitiu a Quintana e Ostrowski de Núñez (2014) concluir que a espécie pertence à família Cryptogonimidae, 1917.

O objetivo principal deste estudo foi usar uma sequência de 28S rDNA de *P. lutzii* para testar a posição taxonômica e classificação dentro da ordem Plagiorchiida, no contexto da análise filogenética de Digenea. Adicionalmente, novas informações morfológicas sobre o tegumento de adultos de *P. lutzii* através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) são apresentadas.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta de material

Espécimes de *Hoplias malabaricus* foram coletados por pescadores locais ou comprados nos mercados de peixe entre 2013 e 2016 em várias localidades no Brasil (bacia do rio Amazônia, bacia do Atlântico Nordeste Ocidental, bacia do Atlântico Sudeste, bacia do rio Araguaia e bacia do rio Paraná). Eles foram examinados com o auxílio de microscópio estereoscópio para coleta dos digenéticos. Os parasitos coletados foram lavados em solução salina e fixados em formalina aquecida (4%) ou em etanol absoluto para estudos moleculares. Os espécimes fixados em formalina aquecida foram

transferidos para etanol 70% para posteriores estudos morfológicos. Nomenclatura e classificação do hospedeiro foram feitas seguindo Froese & Pauly (2018).

2.2. Análise morfológica

Os espécimes fixados em formalina aquecida foram corados com Carmalúmem de Mayer ou tricômio de Gomori, desidratados em uma série ascendente de concentrações etílicas e clarificados com salicilato de metila. Posteriormente, foram montados em bálsamo do Canadá em lâminas permanentes.

Um espécime que foi examinado através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi desidratado através de uma série de concentrações etílicas, seco em ponto crítico com dióxido de carbono, montado em stub de metal com fitas adesivas de carbono, revestido a ouro e, por fim, examinado a 15 kV em um Hitachi Stereoscan Modelo SU1510 (Hitachi Ltd., Tóquio, Japão). Para comparação, espécimes de *P. lutzi*, depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz, Brasil (CHIOC 32154a-i, 33929a-b, 37987a-c, 38071), parasitos de *Hoplias malabaricus*, particularmente aqueles estudados por Fernandes e Kohn (2001) da mesma bacia onde coletamos nossos espécimes foram estudados. Vouchers foram depositados na CHIOC e na Colección Nacional de Helmintos, Universidad Nacional Autónoma de México (CNHE), com os números de acesso 39066 a-b, e 10742, respectivamente.

2.3. Análise molecular

2.3.1. Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

O DNA genômico foi isolado de um único espécime de *P. lutzi* usando o reagente DNazol (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio), seguindo as instruções do fabricante. A amplificação parcial do gene 28 rDNA foi realizada utilizando os primers 391: 5' -AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3' (NADLER; HUDSPETH, 1998) e 536: 5' -CAGCTATCCTGAGGGAAAC-3' (GARCÍA-VARELA; NADLER, 2005). As condições de PCR foram as seguintes: 94 °C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguido por 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto (desnaturação), 50 °C por 1 minuto (anelamento), 72 °C por 1 minuto, e uma extensão pós-amplificação a 72 °C por 10 minutos. Reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se dois primers internos, o 504 5'-CGTCTTGAAACACGGACTAAGG-3' (GARCÍA-VARELA; NADLER, 2005) e o 503 5'-CCTTGGTCCGTGTTTCAAGACG-3' (STOCK et al., 2001).

O gene alvo foi escolhido de acordo com os dados disponíveis no GenBank. 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.

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 Instituto de Biologia da Universidad Nacional Autónoma de México, como segue como segue: 1.5 µl de Big Dye, 1.25 µl de tampão, oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 3.2 pmol/µl, 2.5 µl de produto da PCR purificado e água para completar a reação para o volume final de 10 µl. A reação foi submetida ao mesmo

ciclo de sequenciamento e depois sequenciadas ambas as fitas com o uso do sequenciador de DNA automático da UNAM.

2.3.2. Análise filogenética

Os contíguos resultantes foram alinhados em Geneious Pro 4.8.4® (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) para obter uma única sequência consenso. Para realizar a análise filogenética, a sequência obtida de *P. lutzii* foi alinhada com sequências de 62 espécies de digenéticos da ordem Plagiorchiida, incluídos em 14 famílias (Tabela I). Para fins de comparação genética, foram incluídas sequências de espécies representativas das famílias em que *P. lutzii* foi historicamente colocado. Espécies representando várias superfamílias da ordem Plagiorchiida foram usadas como grupos externos, e o heronimídeo *Heronimus mollis* (Leidy, 1856) Stunkard, 1964 foi usado para o enraizamento da árvore porque está incluído em uma superfamília mais distantemente relacionada.

As sequências foram alinhadas com o software ClustalW (THOMPSON et al., 1994). A análise filogenética foi realizada sob Inferência Bayesiana (BI) e Máxima Verossimilhança (MV), empregando o modelo de substituição de nucleotídeos GTR + GAMA, que foi determinado pelo jModelTest v2 (Darriba et al., 2012).

A inferência bayesiana foi conduzida através de MrBayes v. 3.2.1 (Ronquist et al., 2012), executando duas buscas independentes de MCMC de 4 cadeias a cada corrida (parâmetro de aquecimento = 0.5) para 20 milhões de gerações e árvores de amostragem a cada 1.000 gerações (printfreq = 1.000 samplefreq = 1.000 diagnfreq = 10.000), e os períodos de “burn-in” foram definidos para as primeiras 500 gerações. Uma árvore de consenso com 50% de regra majoritária e suporte nodal (valores de probabilidade posteriores) foi calculada a partir das árvores remanescentes. A inferência de ML (100 réplicas), os parâmetros do modelo e o suporte de bootstrap (1.000 réplicas) foram estimados com o RAxML v. 7.0.4 (STAMATAKIS, 2006). As árvores filogenéticas obtidas da análise foram visualizadas no FigTree v.1.4.3. (RAMBAUT, 2016). A sequência de *P. lutzii* foi depositada no GenBank com o número de acesso MH368357.

3. Resultados

Digenéticos coletados no intestino de *H. malabaricus* do rio Paraná, Paraná, Brasil, foram identificados como *Pseudosellacotyla lutzii* após análise morfológica dos espécimes montados em lâminas permanentes, após comparação com espécimes depositados na CHIOC e também com a redescrição da espécie feita por Quintana e Ostrowski de Núñez (2014).

A prevalência de *P. lutzii* foi de 11% (9 peixes examinados, um infectado com 22 digenéticos). Um indivíduo foi sequenciado e uma análise filogenética foi conduzida para 28S rDNA. O alinhamento final consistiu de 1.456 pares de bases e incluiu sequências de 62 espécies da ordem Plagiorchiida. As frequências de nucleotídicas foram as seguintes: A = 0.209, C = 0.214, G = 0.316 e T = 0.260. A árvore filogenética obtida a partir da análise MV teve uma probabilidade log de - 17898.628266. A análise MV produziu uma única árvore mostrando as relações entre as espécies. A BI produziu uma árvore com uma topologia semelhante à da árvore ML.

A Figura 1 representa a árvore MV sobre a qual as probabilidades posteriores da análise de BI foram incorporadas. Estas árvores mostram que *P. lutzii* não está intimamente relacionada com espécies incluídas em Heterophyidae, Microphallidae e

Faustulidae. Em vez disso, ela está como espécie irmã de *Acanthosthomum burminis* Bhalerao, 1926, embora com baixos valores de “bootstrap” e de probabilidade posterior (55/0.7). No entanto, estas duas espécies estão inequivocamente dentro de Cryptogonimidae, uma relação altamente suportada (99/1). As relações filogenéticas entre os criptogonimídeos com base nas sequências de 28S rRNA disponíveis no Genbank não estão bem resolvidas, uma vez que vários nós são suportados por valores muito baixos de “bootstrap” e de probabilidade posterior (Fig. 1).

Morfologicamente, os espécimes de *P. lutzii* caracterizam-se por possuir um corpo pequeno e piriforme, com um tegumento (ventral e dorsal) armado de espinhos semelhantes a escamas, dorsoventralmente achatados (espinhas pectinadas), estendendo-se da anterior para a posterior parte do corpo (Figuras 2A, B). Os espinhos tegumentares diminuem em densidade da parte anterior para a posterior, mas não em tamanho; eles têm aproximadamente o mesmo comprimento e largura ao longo do corpo, e são serrilhados na extremidade distal, com 3 a 8 digitiformes projeções.

O mesmo padrão serrilhado é exibido por todos os espinhos no corpo, incluindo aqueles na extremidade posterior (Figuras 2C, D). As microfotografias de MEV também mostram como o acetábulo está inserido na superfície ventral do corpo; a área muscular de ambas as ventosas, oral e ventral, não possui espinhos.

Tabela 1. Digenéticos usados na análise filogenética (28S rDNA) em ordem alfabética por espécie e família com o número de acesso do GenBank, hospedeiro, localização geográfica e referência bibliográfica dos isolados.

Espécie	Família	Hospedeiro	Localidade	Genbank Número de acesso	Referência
<i>Acanthochasmus</i> sp.	Cryptogonimidae	<i>Morone chrysops</i>	EUA	KY978880	Kvach et al., 2017
<i>Acanthostomum burminis</i>	Cryptogonimidae	<i>Xenochrophis piscator</i>	Tailândia	KC489791	Kvach et al., 2017
<i>Adlardia novaecaledoniae</i>	Cryptogonimidae	<i>Nemipterus furcosus</i>	New Caledonia	FJ554632	Miller et al., 2009
<i>Anisocladium fallax</i>	Cryptogonimidae	<i>Uranoscopus scaber</i>	Rússia	KY978883	Kvach et al., 2017
<i>Anisocoelium capitellatum</i>	Cryptogonimidae	<i>Uranoscopus scaber</i>	Rússia	KY978882	Kvach et al., 2017
<i>Aphalloides coelomicola</i>	Cryptogonimidae	<i>Kinowitschia caucasia</i>	Bulgária	KJ162159	Stoyanov et al., 2015
<i>Beluesca littlewoodi</i>	Cryptogonimidae	<i>Plectorhinchus gibbosus</i>	Austrália	EF566867	Miller e Cribb, 2007a
<i>Caecincola parvulus</i>	Cryptogonimidae	<i>Micropterus salmoides</i>	EUA	AY222231	Olson et al 2003
<i>Centrovarium</i> sp.	Cryptogonimidae	<i>Perca flavescens</i>	EUA	EF547547	Não publicado
<i>Caulanus thomasi</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus bohar</i>	Austrália	EF428144	Miller and Cribb, 2007a
<i>Centrovarium marinum</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus</i> sp.	Austrália	HM056037	Miller et al., 2010
<i>Chelediadema marjoriae</i>	Cryptogonimidae	<i>Diagramma labiosum</i>	Austrália	EF566866	Miller e Cribb, 2007b
<i>Gynichthys diakidnus</i>	Cryptogonimidae	<i>Plectorhinchus gibbosus</i>	Austrália	FJ907333	Miller e Cribb, 2009
<i>Latuterus maldivensis</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus bohar</i>	Austrália	EF428146	Miller e Cribb, 2007b
<i>Latuterus tkachi</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus bohar</i>	Austrália	EF428145	Miller e Cribb, 2007b
<i>Lobosorchis polygongylus</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus gibbus</i>	Maldivas	FJ154902	Miller et al., 2009
<i>Metadena lutiani</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus bohar</i>	Austrália	KF417630	Miller e Cribb, 2013
<i>Mitotrema anthostomatum</i>	Cryptogonimidae	<i>Cromileptes altivelis</i>	EUA	AY222229	Olson et al., 2003
<i>Neochasmus umbellus</i>	Cryptogonimidae	<i>Morone chrysops</i>	EUA	KY978880	Kvach et al., 2017
<i>Neoparacryptogonimus ovatus</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus carponotatus</i>	Austrália	EF116616	Miller e Cribb, 2007c
<i>Oligogonotylus manteri</i>	Cryptogonimidae	<i>Cichlasoma urophthalmu</i>	México	EU662169	Razo-Mendivil et al., 2008

<i>Pseudosellacotyla lutzi</i>	Cryptogonimidae	<i>Hoplias malabaricus</i>	Brasil	MH368357	Presente estudo
<i>Retrovarium amplorificium</i>	Cryptogonimidae	<i>Symphorus nematophorus</i>	Austrália	EF116609	Miller e Cribb, 2007c
<i>Siphodera vinalwardsii</i>	Cryptogonimidae	<i>Sciaenops ocellatus</i>	EUA	AY222230	Olson et al., 2003
<i>Siphoderina grunnius</i>	Cryptogonimidae	<i>Plectorhinchus gibbosus</i>	Austrália	EU571261	Miller e Cribb, 2008
<i>Siphoderina manilensis</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus vitta</i>	Austrália	HM056035	Miller et al., 2010a
<i>Siphomutabilus gurukun</i>	Cryptogonimidae	<i>Caesio caerulaurea</i>	Austrália	KF417631	Miller e Cribb, 2013
<i>Tabascotrema verai</i>	Cryptogonimidae	<i>Petenia splendida</i>	México	JX023380	Razo-Mendivil et al., 2015
<i>Timoniella imbutiforme</i>	Cryptogonimidae	<i>Atherina boyeri</i>	França	MF491865	Kvach et al., 2017
<i>Varialvus charadrus</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus vitta</i>	Austrália	HM187778	Miller et al., 2010a
<i>Tanaisia fedtschenkoi</i>	Eucotylidae	<i>Anas platyrhynchos</i>	Ucrânia	AY116870	Olson et al., 2003
<i>Antorchis pomacanthi</i>	Faustulidae	<i>Pomacanthus sexstriatus</i>	EUA	AY222268	Olson et al., 2003
<i>Trigonocryptus conus</i>	Faustulidae	<i>Arothron nigropunctatus</i>	EUA	AY222270	Olson et al., 2003
<i>Steringophorus thulini</i>	Fellodistomidae	<i>Coryphaenoides</i>			
<i>Fellodistomum agnotum</i>	Fellodistomidae	<i>(Chalinura) mediterranea</i>	Reino Unido	AJ405297	Bray et al., 1999
<i>Ascocotyle pindaramensis</i>	Heterophyidae	<i>Anarhiehas lupus</i>	Escócia	AJ405289	Bray et al., 1999
<i>Centrocestus formosanus</i>	Heterophyidae	<i>Poecilia vivipara</i>	Brasil	KJ094561	Borges et al., 2017
<i>Cryptocotyle lingua</i>	Heterophyidae	<i>Mesocricetus auratus</i>	Tailândia	HQ874609	Thaenkham et al., 2011
<i>Euryhelmin costaricensis</i>	Heterophyidae	<i>Littorina littorea</i>	Alemanha	AY222228	Olson et al., 2003
<i>Galactosomum lacteum</i>	Heterophyidae	<i>Hynobius lichenatus</i>	Japão	AB521799	Sato et al., 2010
<i>Haplochoides</i> sp.	Heterophyidae	<i>Phalacrocorax carbo</i>	Ucrânia	AY222227	Olson et al., 2003
<i>Haplorchis popelkae</i>	Heterophyidae	<i>Arius graeffei</i>	Austrália	AY222226	Olson et al., 2003
<i>Heterophyes heterophyes</i>	Heterophyidae	<i>Elseya dentata</i>	Austrália	EU883584	Snyder and Tkach, 2009
<i>Metagonimoides oregonensis</i>	Heterophyidae	<i>Mugil cephalus</i>	Itália	KU559553	Masala et al., 2016
<i>Metagonimus hakubaensis</i>	Heterophyidae	<i>Pleurocera proxima</i>	EUA	JQ995473	Belden et al., 2012
<i>Pholeter gastrophilus</i>	Heterophyidae	<i>Lethenteron reissneri</i>	Japão	KM061388	Pornruseetairatn et al., 2016
<i>Procerovum cheni</i>	Heterophyidae	<i>Tursiops truncatus</i>	Espanha	KT883853	Fraija-Fernández et al., 2015
		<i>Anabas testudineus</i>	Tailândia	HM004179	Thaenkham et al., 2010

<i>Pygidiopsis macrostomum</i>	Heterophyidae	<i>Poecilia vivipara</i>	Brasil	KT877409	Borges et al., 2017
<i>Stellantchasmus falcatus</i>	Heterophyidae	<i>Homo sapiens</i>	Vietnã	HM004174	Thaenkham et al., 2010
<i>Stictodora</i> sp.	Heterophyidae	<i>Liza saliens</i>	Itália	KU559563	Masala et al., 2016
<i>Heronimus mollis</i>	Heronimidae	<i>Chelydra serpentina</i>	EUA	AY116878	Olson et al., 2003
<i>Maritrema arenaria</i>	Microphallidae	Barnacle	Reino Unido	AY220629	Tkach et al., 2003
<i>Microphallus abortivus</i>	Microphallidae	<i>Hydrobia ulvae</i>	EUA	AY220626	Tkach et al., 2003
<i>Amphimerus ovalis</i>	Opistorchiidae	<i>Trionyx muticus</i>	EUA	AY116876	Olson et al., 2003
<i>Clonorchis sinensis</i>	Opistorchiidae	<i>Homo sapiens</i>	Vietnã	JF823989	Thaenkham et al., 2011
<i>Opisthorchis noverca</i>	Opistorchiidae	<i>Sus scrofa domestica</i>	Índia	KC295443	Não publicado
<i>Pachyopsolus irrotus</i>	Pachyopsolidae	<i>Lepidochelys olivacea</i>	México	AY222274	Olson et al., 2003
<i>Phaneropsolus praomydis</i>	Phaneropsolidae	<i>Rhabdomys dilectus</i>	Malawi	KJ700422	Kanarek et al., 2014
<i>Pleurogenes claviger</i>	Pleurogenidae	<i>Rana temporaria</i>	Ucrânia	AF151925	Tkach et al., 2000
<i>Prosthogonimus cuneatus</i>	Prosthogonimidae	<i>Sturnus vulgaris</i>	Ucrânia	AY220634	Tkach et al., 2003
<i>Renicola</i> sp.	Renicolidae	<i>Numenius arquata</i>	Ucrânia	AY116871	Olson et al., 2003
<i>Zoogonoides viviparus</i>	Zoogonidae	<i>Callionymus lyra</i>	Reino Unido	AY222271	Olson et al., 2003

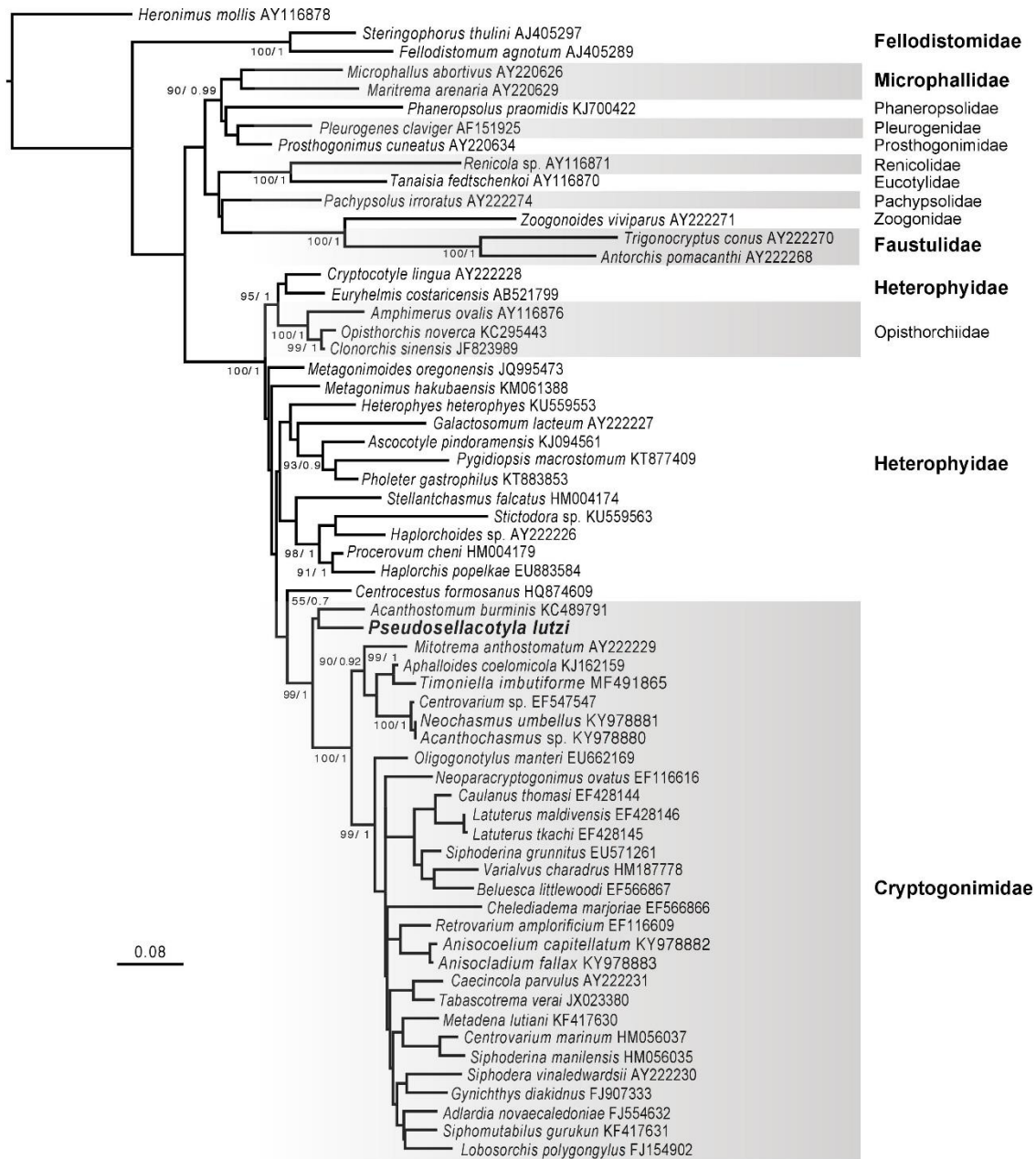


Figura 1. Análise filogenética de alguns membros da ordem Plagiorchiida estimada por MV e IB usando sequências parciais de 28S rDNA mostrando a posição de *Pseudosellacotyla lutzi*. O ID da sequência do GenBank segue o nome da espécie. Probabilidade posterior e os valores de suporte de máxima verossimilhança são dados acima dos ramos (probabilidades inferiores a 0.90 e valores “bootstrap” inferiores a 90 não foram relatados, exceto para o clado de *Acanthostomum* e *Pseudosellacotyla*).

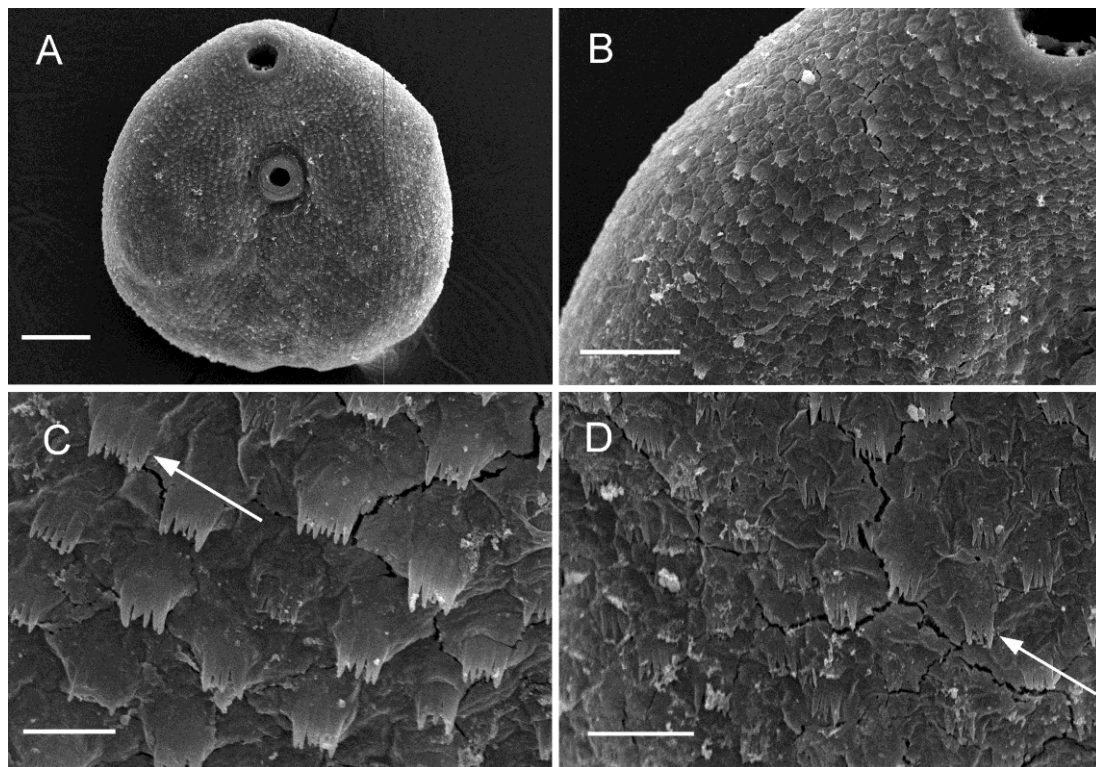


Figura 2. A-D. Microscopia eletrônica de varredura de *Pseudosellacotyla lutzi* (Freitas, 1941) Yamaguti, 1954. **A**, adulto, vista ventral; **B**, superfície da região anterior de *P. lutzi*; **C**, detalhe dos espinhos pectinados da região anterior mostrando 8 projeções digitiformes; **D**, detalhe dos espinhos da região posterior mostrando 3 projeções digitiformes. Barras de escala: A = 50 μ m, B = 25 μ m, C = 5 μ m, D = 10 μ m.

4. Discussão

Nossos espécimes foram identificados como *P. lutzi*, pois estão de acordo com a redescritção recentemente apresentada por Quintana e Ostrowski de Núñez (2014). Além do mais, alguns dos espécimes estudados por estes autores foram obtidos da mesma área geográfica, na bacia do rio Paraná, que desemboca no oceano Atlântico Sul. *Pseudosellacotyla lutzi* foi originalmente descrito como *Sellacotyla lutzi* Freitas, 1941, e mais tarde transferido para o gênero *Pseudosellacotyla* Yamaguti, 1954 por conta da presença de espinhos no tegumento. Esses espinhos não foram mencionados na descrição original (FREITAS, 1941; YAMAGUTI, 1954). Esta espécie foi considerada membro de Nanophyetidae, Heterophyidae, Microphallidae (ver FREITAS, 1941; YAMAGUTI, 1954, 1958, 1971) e, mais recentemente, Faustulidae (BRAY, 2008); no entanto, Quintana e Ostrowski de Núñez (2014) evidenciaram que *P. lutzi*, na verdade, pertence à família Cryptogonimidae com base em comparações morfológicas entre os estágios do ciclo de vida, complementados com infecções experimentais entre hospedeiros intermediários e definitivos. Uma discussão detalhada sobre a separação de *P. lutzi* de Faustulidae foi apresentada por Quintana e Ostrowski de Núñez (2014), e caracteres, como a vesícula excretora em forma de V com braços curtos, a presença da ventosa ventral embebida na superfície ventral e cercária opisthorchioid que se desenvolve em

rediae em gastrópodes coloca a espécie em Cryptogonimidae. Quintana e Ostrowski de Núñez (2014) notaram uma estreita semelhança entre *P. lutzi* e espécies de *Acanthostomum* Looss, 1899. Nossa análise filogenética baseada em 28S rDNA revelou que *P. lutzi* é uma espécie irmã de *Acanthostomum burminis* (Bhalerao, 1926) Bhalerao, 1936, corroborando ainda mais com os achados de Quintana e Ostrowski de Núñez (2014) baseados em estudos morfológicos e características do ciclo de vida. Além disso, a topologia da árvore mostrou que *P. lutzi* e *A. burminis* estão alinhados dentro dos Cryptogonimidae, com alto suporte das análises de MV e BI. No geral, a família Cryptogonimidae é apresentada como monofilética, embora o suporte para vários nós sejam muito baixos. Provavelmente, esses suportes baixos sejam resultado de amostragem incompleta do grupo; relativamente poucas sequências de DNA estão disponíveis para criptogonimídeos e nem todos os gêneros têm uma espécie sequenciada representativa, em contraste com a considerável diversidade da família.

Espécies de *Pseudosellacotyla* e *Acanthostomum* são caracterizadas por terem espinhos tegumentares e pela ausência de um gonotil, embora possam ser distinguidas porque espécies de *Acanthostomum* possuem a ventosa oral em forma de funil com uma única fileira de espinhos, cecos longos e testículos tandem.

Espécies de *Retrovarium* Miller e Cribb, 2007 compartilham com *P. lutzi* a presença de espinhos tegumentares, proporções corporais, distribuição da vitelária e ausência de gonotil e espinhos na ventosa oral. Dados moleculares de espécies de *Retrovarium* estão disponíveis no GenBank, no entanto, nossa análise filogenética mostrou que *Pseudosellacotyla* e *Retrovarium* não são próximos (figura 1). Além disso, as 13 espécies do gênero *Retrovarium* que parasitam peixes marinhos (a maioria deles na Austrália, Polinésia Francesa e Maldivas) não mostram nenhum padrão de associação de hospedeiro prontamente discernível (ver MILLER; CRIBB, 2007c).

Os resultados da nossa análise filogenética contrastam com avaliações baseadas na morfologia, em termos das relações entre alguns gêneros de Cryptogonimidae. Por exemplo, Brooks (1980) e Brooks e Holcman (1993), realizaram uma análise filogenética baseada na morfologia da subfamília Acanthostominae. Nestas análises os gêneros *Acanthostomum* e *Timoniella* Rebecq, 1960 foram classificados como pertencentes à subfamília Acanthostominae, juntamente com gêneros os *Gymnatrema* Morozov, 1955, *Caimanacola* Freitas e Lent, 1938, e *Proctocaecum* Baugh, 1957. Nossa árvore filogenética mostra que *Acanthostomum* e *Timoniella* não estão intimamente relacionados (ver Figura 1). *Timoniella imbutiforme* (Molin, 1859) Gohar, 1934 está como espécie irmã de *Aphalloides coelomicola* Dollfus, Chabaud e Golvan, 1957. Essas relações filogenéticas são consistentes com as topologias obtido por Kvach et al. (2017, 2018). A análise filogenética de Brooks e Holcman (1993) baseada em dados morfológicos sugeriu que o gênero *Timoniella* fosse basal, e *Acanthostomum* e *Caimanacola* grupos irmãos, embora nenhum outro criptogonimídeo tenha sido incluído na análise, eles supuseram que a subfamília Acanthostominae fosse monofilética. Mais estudos são necessários para uma melhor compreensão da história evolutiva dos membros da família Cryptogonimidae, e ainda uma amostragem mais densa de representantes que inclua espécies representativas de mais gêneros é necessária antes que conclusões robustas possam ser alcançadas.

A superfície do tegumento foi estudada em poucas espécies de criptogonimídeos usando MEV (ver, TKACH; SNYDER, 2003; OSTROWSKI et al., 2011a, 2011b). O tegumento das espécies de *Paraspina* Pearse, 1920, reportados como parasitos de siluriformes e gymnotiformes na América do Sul (ver KOHN et al., 2007; OSTROWSKI DE NUÑEZ et al., 2017) é relativamente semelhante ao descrito neste estudo para *P. lutzi*.

Espécies de *Parspina* podem ser facilmente distinguidas de *P. lutzi* por terem um corpo alongado, uma coroa de espinhos oral e um gonotil; no entanto, os espinhos ao longo do corpo se assemelham àqueles mostrados por *P. lutzi*. O tegumento de *P. lutzi* possui espinhos serrilhados e semelhantes a escamas, densidade diminui da parte anterior para a posterior (ventral e dorsal), mas possuem aproximadamente o mesmo tamanho ao longo do corpo; o tamanho uniforme dos espinhos tegumentares é uma condição também encontrada em *Acanthostomum macroclomidis* Tkach e Snyder, 2003, um cryptogonimídeo estudado através de MEV (TKACH; SNYDER, 2003); no entanto, essa condição contrasta com espécies de *Parspina* onde os espinhos diminuem também em tamanho da parte anterior do corpo, e a extremidade distal de cada coluna é altamente serrilhada (OSTROWSKI et al., 2011a; 2011b).

Além disso, em *P. lutzi* a extremidade distal de cada espinho possui de 3 a 8 projeções digitiformes. É possível que a forma dos espinhos em escala (ou espinhos pectinados) em criptogonimídeos revelados através de MEV pode resultar em caráter para distinguir espécies. Antonelli et al. (2014) descobriram que a superfície corpórea de *Apophallus tubarium* (Rudolphi, 1819) Poche, 1926 se assemelha ao que foi estabelecido para outros criptogonimídeos, mas esses autores também referiram que a maturação dos espinhos tegumentares de digenéticos podem mostrar mudanças graduais na forma e número de projeções digitiformes. Este caractere parece ser variável entre criptogonimídeos e, apesar de também ser exibido por outras espécies de digenéticos (ver ANTONELLI et al., 2014), pode ser usado para fins taxonômicos de diferenciação em nível de gênero, mas isso precisa ser determinado pela análise do tegumento de mais espécies.

Na América do Sul, Cryptogonimidae é representada por 16 espécies alocadas em 11 gêneros, dos quais 10 são monotípicos, incluindo *Pseudosellacotyla* (CHOUDHURY et al., 2016). *Pseudosellacotyla lutzi* é de particular interesse devido à sua alta especificidade por *H. malabaricus*. Além disso, a espécie foi encontrada em uma ampla distribuição geográfica, incluindo Argentina, Brasil e Colômbia. Seja ou não *Pseudosellacotyla lutzi* uma espécie com ampla distribuição geográfica ou um complexo de espécies crípticas (ver PÉREZ-PONCE DE LEÓN; NADLER, 2010), é necessário uma maior amostragem molecular de indivíduos em toda a extensão geográfica, e essa ampla extensão faz de *P. lutzi* um modelo interessante para realizar um estudo de prospecção molecular (sensu BLOUIN, 2002). Outros criptogonimídeos demonstraram representar um complexo de espécies crípticas no que antes era considerada uma única espécie (ver MILLER; CRIBB, 2007b; MILLER et al., 2010b; RAZO-MENDIVIL et al., 2015).

Avaliações recentes da diversidade de helmintos parasitos de peixes dulcícolas requerem o uso de sequências de DNA (PÉREZ-PONCE DE LEÓN; CHOUDHURY, 2010); nesse contexto, nosso estudo foi útil para corroborar a classificação e determinação das relações filogenéticas de *P. lutzi* através de dados moleculares. O inventário dos digenéticos parasitos peixes dulcícolas na América do Sul está longe de ser completo, especialmente considerando a extraordinária riqueza de espécies de peixes na área (ver KOHN et al., 2007; CHOUDHURY et al., 2016; OSTROWSKI DE NÚÑEZ et al., 2017); ainda, estudos de sistemática molecular de digenéticos parasitos de peixes de água doce na América do Sul ainda são muito escassos; tais estudos são necessários para explicações robustas sobre a distribuição de parasitos de peixes dulcícolas em um gradiente latitudinal, em grande parte explicado pelo chamado Grande Intercâmbio Biótico Americano (GABI, do inglês “Great American Biotic Interchange”) como foi

citado por CHOUDHURY et al., (2017).

5. Referências

ANTONELLI, L.; QUILICHINI, Y.; FOATA, J.; MARCHAND, B. Topography and ultrastructure of the tegument of *Aphallus tubarium* (Rodolphi, 1819) Poche, 1926 (Digenea: Cryptogonimidae), intestinal parasite of the common *Dentex dentex* (Linnaeus 1758) from Valinco Gulf. **Acta Parasitologica**, v 59, n. 4, p. 615–624, 2014.

BELDEN, L. K.; PETERMAN, W. E.; SMITH, S. A.; BROOKS, L. R.; BENFIELD E. F.; BLACK, W. P.; WODJAK, J. M. *Metagonimoides oregonensis* (Heterophyidae: Digenea) Infection in pleurocerid snails and *Desmognathus quadramaculatus* salamander larvae in southern Appalachian streams. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 4, p. 760–767, 2012.

BLOUIN, M. S. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 527–531, 2002.

BORGES, J. N.; COSTA, V. S.; MANTOVANI, C.; BARROS, E.; SANTOS, E. G. N.; MAFRA, C. L.; SANTOS, C. P. Molecular characterization and confocal laser scanning microscopic study of *Pygidiopsis macrostomum* (Trematoda: Heterophyidae) parasites of guppies *Poecilia vivipara*. **Journal of Fish Diseases**, v. 40, n. 2, p. 191–203, 2017.

BRAY, R. A. Family Faustulidae Poche, 1926. In Keys to the Trematoda, R. A. Bray, D. I. Gibson, and A. Jones (eds.). **CABI Publishing**, Wallingford, Oxfordshire, U.K., v. 3, p. 509–525. 2008.

BRAY, R. A.; LITTLEWOOD, D. T. J.; HERNIOU, E. A.; HENDESDON, R. E. Digenean parasites of deep-sea teleosts: A review and case studies of intrageneric phylogenies. **Parasitology**, v. 119, p. 125–144, 1999.

BROOKS, R. D. Revision of the Acanthostominae Poche, 1926 (Digenea: Cryptogonimidae). **Zoological Journal the Linnean Society**, v. 70. n. 4, p. 313–382, 1980.

BROOKS, R. D.; HOLCMAN, B. Revised classification and phylogenetic hypothesis for the Acanthostominae Looss, 1899 (Digenea: Opisthorchiformes: Cryptogonimidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 106, n. 2, p. 207–220, 1993.

CHOUHDURY, A.; AGUIRRE-MACEDO, M. L.; CURRAN, S.; DE NÚÑEZ, M. O.; OVERSTREET, R. M.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; SANTOS, C. P. Trematode diversity in freshwater fishes of the Globe II: ‘New World’. **Systematic Parasitology** v. 93, n. 3, p. 271–282, 2016.

CHOUHDURY, A.; GARCÍA-VARELA, M.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. Parasites of freshwater fishes and the Great American Biotic Interchange: A bridge too far? **Journal of Helminthology** v. 91, n. 2, p. 174 – 196, 2017.

COSTA, D. P. C.; MONTERO, C. M.; BRASIL-SATO, M. C. Digenea of *Hoplais intermedius* and *Hoplais malabaricus* (Actinopterygii, Erythrinidae) from upper São

Francisco River, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** v. 24, n. 2, p. 129–135, 2015.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. D. 2012. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, p. 772–772, 2012.

FERNANDES, B. M. M.; KOHN, A. On some trematodes parasites of fishes from Paraná river. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n. 3, p. 461–466, 2001.

FRAIJA-FERNÁNDEZ, N.; FERNÁNDEZ, M.; RAGA, J. A.; AZNAR, F. J. Life-history trade-offs in a generalist digenean from cetaceans: The role of host specificity and environmental factors. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 659, 2015.

FREITAS, J. F. T. *Sellacotyle lutzii* n.sp., trematodeo parasito de *Hoplias malabaricus* Bloch. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 13, p. 17–19, 1941.

FROESE, R., AND D. PAULY (eds.). 2017. FishBase. **World Wide Web electronic publication**. Disponível em: www.fishbase.org, versão (06/2017).

GARCÍA-VARELA, M.; NADLER, S. A. Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 6, p. 1401–1409, 2005.

KANAREK, G.; ZALESNY, G.; SITKO, J.; TKACH, V. V. Phylogenetic relationships and systematic position of the families Cortrematidae and Phaneropsolidae (Platyhelminthes: Digenea). **Folia Parasitologica**, v. 61, n. 6, p. 523–528, 2014.

KOHN, A.; FERNANDES, B. M. M. Estudo comparativo dos helmintos parasitos de peixes do rio Mogi Guassu, coletados nas excursões realizadas entre 1927 e 1985. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 4, p. 483–500, 1987.

KOHN, A.; FERNANDES, B. M. M.; COHEN, S. C. South American trematodes Parasites of fishes. **Imprinta Express**, Rio de Janeiro, 318 p, 2007.

KOHN, A.; FERNANDES, B. M. M.; MACEDO, B.; ABRAMSON, B. Helminths parasites of freshwater fishes from Pirassununga, SP, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 327–336, 1985.

KOHN, A.; MORAVEC, F.; COHEN, S. C.; CANZI, C.; TAKEMOTO, R. M.; FERNANDES, B. M. M. Helminths of freshwater fishes in the reservoir of the hydroelectric power station of Itaipu, Paraná, Brazil. **Check List**, v. 7, n. 5, p. 681–690, 2011.

KVACH, Y.; BRYJOVÁ, A.; SASAL, P.; WINKLER, H. M. A revision of the genus *Aphalloides* (Digenea: Cryptogonimidae), parasites of European brackish water fishes. **Parasitology Research**, v. 116, n. 7, p. 1973–1980, 2017.

KVACH, Y.; BRYJOVÁ, A.; SASAL, P.; WINKLER, H. M. 2018. The taxonomic and phylogenetic status of digeneans from the genus *Timoniella* (Digenea: Cryptogonimidae) in the Black and Baltic seas. **Journal of Helminthology**, v. 92, n. 5, p. 1-8, 2018.

MASALA, S.; PIRAS, M. C.; SANNA, D.; CHAI, J. Y.; JUNG, B. K.; SOHN, W. M.; MERELLA, P. Epidemiological and molecular data on heterophyid trematode metacercariae found in the muscle of grey mullets (Osteichthyes: Mugilidae) from Sardinia (western Mediterranean Sea). **Parasitology Research**, v. 115, n. 9, p. 3409–3417, 2016.

MILLER, T. L.; ADLARD, R. D.; BRAY, R. A.; JUSTINE, J. L.; CRIBB, T. H. Cryptic species of *Euryakaina* n.g. (Digenea: Cryptogonimidae) from sympatric lutjanids in the Indo-West Pacific. **Systematic Parasitology**, v. 77, n. 3, p. 185–204, 2010a.

MILLER, T. L.; BRAY, R. A.; JUSTINE, J. L.; CRIBB, T. H. *Varialvus* gen. nov. (Digenea, Cryptogonimidae), from species of Lutjanidae (Perciformes) off the Great Barrier Reef, New Caledonia and the Maldives. **Acta Parasitologica**, v. 55, n. 4, p. 327–339, 2010b.

MILLER, T. L.; CRIBB, T. H. Two new cryptogonimid genera *Beluesca* n. gen. and *Chelediadema* n. gen. (Digenea: Cryptogonimidae) from tropical Indo-West Pacific Haemulidae (Perciformes). **Zootaxa**, v. 1543, p. 45–60, 2007a.

MILLER, T. L.; CRIBB, T. H. Two new cryptogonimid genera (Digenea, Cryptogonimidae) from *Lutjanus bohar* (Perciformes, Lutjanidae): Analyses of ribosomal DNA reveals wide geographic distribution and presence of cryptic species. **Acta Parasitologica**, v. 52, n. 2, p. 104-113, 2007b.

MILLER, T. L.; CRIBB, T. H. Coevolution of *Retrovarium* n. gen. (Digenea: Cryptogonimidae) in Lutjanidae and Haemulidae (Perciformes) in the Indo-West Pacific. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 8-9, p. 1023-1045, 2007c.

MILLER, T. L.; CRIBB, T. H. Eight new species of *Siphoderina* Manter, 1934 (Digenea, Cryptogonimidae) infecting Lutjanidae and Haemulidae (Perciformes) off Australia. **Acta Parasitologica**, v. 53, n. 4, p. 344–364, 2008.

MILLER, T. L.; CRIBB, T. H. *Gynichthys diakidnus* n. g., n. sp. (Digenea: Cryptogonimidae) from the grunt *Plectorhinchus gibbosus* (Lacépède, 1802) (Perciformes: Haemulidae) off the Great Barrier Reef, Australia. **Systematic Parasitology**, v. 74, n. 2, p. 103–112, 2009.

MILLER, T. L.; CRIBB, T. H. Dramatic phenotypic plasticity within species of *Siphomutabilus* n. g. (Digenea: Cryptogonimidae) from Indo-Pacific caesionines (Perciformes: Lutjanidae). **Systematic Parasitology**, v. 86, n. 2, p. 101–112, 2013.

MILLER, T. L.; DOWNIE, A. J.; CRIBB, T. H. Morphological disparity despite genetic similarity; new species of *Lobosorchis* Miller & Cribb, 2005 (Digenea: Cryptogonimidae) from the Great Barrier Reef and the Maldives. **Zootaxa**, v. 1992, p. 37–52, 2009.

NADLER, S. A.; HUDSPETH, D. S. Ribosomal DNA and phylogeny of the Ascaridoidea (Nemata: Secernentea): Implications for morphological evolution and classification. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 221–236, 1998.

OLSON, P. D.; CRIBB, T. H.; TKACH, V. V.; BRAY, R. A.; LITTLEWOOD, D. T. J. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 7, p. 733–755, 2003.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M.; ARREDONDO, N. J.; DOMA, I. L.; GIL DE PERTIERRA, A. Redescription of *Parspina argentinensis* (Szidat, 1954) (Digenea: Cryptogonimidae) from freshwater fishes (Pimelodidae) in the basins of the Paraná and La Plata Rivers, Argentina, with comments on *P. bagre* Pearse, 1920. **Systematic Parasitology**, v. 78, n. 1, p. 27–40, 2011a.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M.; ARREDONDO, N. J.; GIL DE PERTIERRA, A. Two new species of *Parspina* Pearse, 1920 (Digenea: Cryptogonimidae) from freshwater fishes (Gymnotiformes) of the Paraná River basin in Argentina. **Systematic Parasitology**, v. 80, p. 67–79, 2011b.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M.; ARREDONDO, N. J.; GIL DE PERTIERRA, A. 2017. Adult Trematodes (Platyhelminthes) of freshwater fishes from Argentina: A checklist. **Revue suisse de Zoologie**, v. 124, n. 1, p. 91–113, 2017.

OYAKAWA, O. T. Family Erythrinidae. Check list of the freshwater fishes of South and Central America, R. E. Reis, S. O. Kullander, and C. J. Ferraris Jr. (eds.). **Edipucrs**, Porto Alegre, Brazil, p. 238–240, 2003.

PÉREZ-CAICEDO, A.; LENIS, C.; VELEZ-ESCOBAR, I.; BECHARA-ESCUADERO, M. Nuevo registro de *Pseudosellacotyla lutzi* (Digenea: Faustulidae) en *Hoplias malabaricus* (Pisces: Erythrinidae) en Chocó, Colombia. **Investigación Biodiversidad y Desarrollo**, v. 29, n. 1, p. 110–112, 2010.

PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; CHOUDHURY, A. Biogeography of helminth parasites of freshwater fishes in Mexico: The search for patterns and processes. **Journal of Biogeography**, v. 32, n. 4, p. 645–659, 2005.

PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; CHOUDHURY, A. Parasite inventories and DNA-based taxonomy: Lessons from helminths of freshwater fishes in a megadiverse country. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 1, p. 236–244, 2010.

PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; NADLER, S. A. What we don't recognize can hurt us: A plea for awareness about cryptic species. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 2, p. 453–464, 2010.

PORNRUSEETAI, S.; KINO, H.; SHIMAZU, T.; NAWA, Y.; SCHOLZ, T.; RUANGSITTICHAJ, J.; THAENKHAM, U. A molecular phylogeny of Asian species of the genus *Metagonimus* (Digenea)--small intestinal flukes--based on representative Japanese populations. **Parasitology Research**, v. 115, n. 3, p. 1123–1130, 2016.

QUINTANA, M. G., OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M. The life cycle of *Pseudosellacotyla lutzi* (Digenea: Cryptogonimidae), in *Aylacostoma chloroticum* (Prosobranchia: Thiariidae), and *Hoplialis malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae), in Argentina. **Journal of Parasitology** v. 100, n. 6, p. 805–811, 2014.

RAMBAUT, A. 2016. FigTree-v1. 4.2. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Acessado em 6 de dezembro de 2017.

RAZO-MENDIVIL, U.; ROSAS-VALDEZ, R.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. A new cryptogonimid (Digenea) from the Mayan cichlid, *Cichlasoma urophthalmus* (Osteichthyes: Cichlidae), in several localities of the Yucatán Peninsula, Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 6, p. 1371–1378, 2008.

RAZO-MENDIVIL, U.; ROSAS-VALDEZ, R.; RUBIO-GODOY, M.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. The use of mitochondrial and nuclear sequences in prospecting for cryptic species in *Tabascotrema verai* (Digenea: Cryptogonimidae), a parasite of *Petenia splendida* (Cichlidae) in Middle America. **Parasitology International**, v. 64, n. 2, p. 173–181, 2015.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HOHNA, S.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; M. A. HUELSENBACK, M. A. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012.

SATO, H.; IHARA, S.; INABA, O.; UNE, Y. 2010. Identification of *Euryhelminis costaricensis* metacercariae in the skin of Tohoku hynobiid salamanders (*Hynobius lichenatus*), northeastern Honshu, Japan. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 832–842, 2010.

SNYDER, S. D.; TKACH, V. V. *Haplorchis popelkae* n. sp. (Digenea: Heterophyidae) from short-necked turtles (Chelidae) in Northern Australia. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 204–207, 2009.

STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2688–2690, 2006.

STOCK, S. P.; CAMPBELL, J. F.; NALDER, S. A. Phylogeny of *Steinermata* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinerematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Journal of Parasitology** v. 87, n. 4, p. 877–899, 2001.

STOYANOV, B.; NEOV, B.; PANKOV, P.; RADOSLAVOV, G.; HRISTOV, P.; GEORGIEV, B. B. Redescription of *Aphalloidescoelomicola* Dollfus, Chabaud & Golvan, 1957 (Digenea, Opisthorchioidea) based on specimens from *Knipowitschia caucasica* (Berg) (Actinopterygii, Gobionellidae) from a Black Sea lagoon, with comments on the systematic position of the genus. **Systematic Parasitology**, v. 91, n. 1, p. 1–12, 2015.

TAKEMOTO, R. M., PAVANELLI, G. C.; LIZAMA, M. A. P.; LACERDA, A. C. F.; YAMADA, F. H.; MOREIRA, L. H. A.; BELLAY, S. Diversity of parasites of fish from the Upper Paraná River floodplain, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 691–705, 2009.

THAENKHAM, U.; DEKUMYOY, P.; KOMALAMSIRA, C.; SATO, M.; WAIKAGUL, J. Systematics of the subfamily Haplorchiinae (Trematoda: Heterophyidae), based on nuclear ribosomal DNA genes and ITS2 region. **Parasitology International** v. 59, n. 3, p. 460–465, 2010.

THAENKHAM, U.; NAWA, Y.; BLAIR, D.; PAKDEE, W. Confirmation of the paraphyletic relationship between families Opisthorchiidae and Heterophyidae using small and large subunit ribosomal DNA sequences. **Parasitology International** v. 60, n. 4, p. 521–523, 2011.

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.

TKACH, V.; LITTLEWOOD, D. T. J.; OLSON, P. D.; KINSELLA, J. M.; SWIDERSKI, Z. Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). **Systematic Parasitology** v. 56, n. 1, p. 1–15, 2003.

TKACH, V. V.; PAWLOWSKY, J.; MARIAUX, J. Phylogenetic analysis of the suborder Plagiorchiata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial lsrDNA sequences. **International Journal for Parasitology** v. 30, n. 1, p. 83–93, 2000.

TKACH, V. V.; SNYDER, S. D. *Acanthostomum macroclemys* n. sp. (Digenea: Cryptogonimidae: Acanthostominae) from the alligator snapping turtle, *Macrolemys temmincki*. **Journal of Parasitology** v. 89, n. 1, p. 159–167, 2003.

YAMAGUTI, S. Systema Helminthum. Part I. Digenetic trematodes of fishes. **Satyū Yamaguti** (published by author), Tokyo, Japan, 405 p, 1954.

YAMAGUTI, S. Systema Helminthum. The digenetic trematodes of vertebrates. **Interscience Publishers**, New York, New York, v. 1, 1575 p, 1958.

YAMAGUTI, S. Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. **Keigaku Publishing Co.**, Tokyo, Japan, Vol. I, 1074 p.; Vol. II, 349 p, 1971.

Capítulo IV

Diagnóstico morfológico e molecular de *Acanthostomum gnerii* Szidat, 1954 (Digenea: Cryptogonimidae) parasitando *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae), Pará, Brasil.

Resumo

O cryptogonimídeo *Acanthostomum gnerii* parasito de *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) foi estudado através de análise molecular (28S rDNA e *cox1* mtDNA) e morfológica. Essa espécie foi encontrada pela primeira vez no rio Marapanim, estado do Pará, Brasil. Um de dez espécimes de *R. quelen* (10%) foi encontrado infectado. A posição filogenética de *A. gnerii* foi determinada pela caracterização molecular de 28S rDNA, e esta espécie mostrou similaridade de 93% com *A. burminis*.

Palavras-chave: 28S rDNA, *cox1* mtDNA, MEV

Abstract

The cryptogonimid *Acanthostomum gnerii* parasite of *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) was studied by molecular (28S rDNA and *cox1* mtDNA) and morphological analysis. This species was found for the first time in the Marapanim river, state of Pará, Brazil. One of ten specimens of *R. quelen* (10%) was found infected. The phylogenetic position of *A. gnerii* was determined by the molecular characterization of 28S rDNA, and this species showed similarity of 93% with *A. burminis*.

Key-words: 28S rDNA, *cox1* mtDNA, SEM

1. Introdução

Cryptogonimidae Ward, 1917 é uma família rica de espécies (mais ou menos 370 species) com membros parasitando intestino e ceco pilórico de teleósteos marinhos, dulcícolas, répteis e ocasionalmente anfíbios (MILLER; CRIBB, 2007; MILLER; CRIBB, 2013; MILLER et al., 2009; MILLER et al., 2010a; MILLER et al., 2010b; CRIBB; GIBSON, 2017; TKACH; SNYDER, 2003; TKACH; BUSH, 2010; FERNANDES et al., 2013; MARTÍNEZ-AQUINO et al., 2017).

Na América do Sul, esta família está representada por 16 espécies em 11 gêneros parasitando peixes dulcícolas. Dez gêneros são monotípicos e um (*Parspina* Pearse, 1920) possui seis espécies, sendo quatro delas descritas nos últimos anos (CHOUDHURY et al, 2016). Um cryptogonimídeo comumente reportado no trato gastrointestinal de peixes Siluriformes nesta região e também na América Central é *Acanthostomum gnerii* (LAMOTHE-ARGUMEDO; PONCIANO-RODRIGUEZ,1985; WATSON, 1976; LUNASCHI, 1968; OSTROWSKI DE NUNEZ; GIL DE PERTIERRA, 1991; 1995; FORTES; HOFFMANN, 1995; KHON; FRÓES, 1995; CORRÊA; BRASIL-SATO, 2008; MARTINS et al., 2016).

Acanthostomum gnerii foi descrito por Szidat (1954) no Rio Paraná, Argentina, parasitando *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae), dentre demais características, com dois cecos intestinais. Posteriormente, Lunaschi (1986) redescreveu a espécie por observar com maiores detalhes as estruturas reprodutivas e sua redescrição se fundou, principalmente, pela observação de apenas um ceco intestinal. O ciclo de vida deste digenético é um dos poucos elucidados entre os trematódeos parasitos de peixes da América do Sul (OSTROWSKI DE NUNEZ; GIL DE PERTIERRA, 1991).

Desde a descrição original, diversos autores estudaram a morfologia de *A. gnerii* e recentemente, Martins et al., (2016) forneceu dados de MEV e dados histológicos desta espécie coletada em *Rhamdia quelen* no rio Madre, Santa Catarina, Brasil, além de fazer um estudo comparativo das medidas.

O presente estudo providencia uma análise morfológica e a primeira caracterização genética de *Acanthostomum gnerii*.

2. Material e Métodos

2.1.Coleta de material

Espécimes de *Rhamdia quelen* foram coletados por pescadores locais no Rio Marapanim (Bacia do Atlântico Norte) em Igarapé-açu, Pará em 2016. Eles foram examinados com o auxílio de microscópio estereoscópio para coleta dos digenéticos. Os digenéticos coletados foram lavados em solução salina e fixados em formalina aquecida (4%) ou em etanol absoluto para estudos moleculares. Os espécimes fixados em formalina aquecida foram transferidos para etanol 70% para posteriores estudos morfológicos. Nomenclatura e classificação do hospedeiro foram feitas seguindo Froese & Pauly (2018).

2.2. Análise morfológica

Os espécimes fixados em formalina aquecida foram corados com Carmalúmem de Mayer e foram desidratados em uma série ascendente de concentrações etílicas. Posteriormente, foram clarificados com eugenol (óleo de cravo) e montados em bálsamo do Canadá em lâminas permanentes. Para comparação, os seguintes vouchers de *A. gnerii* e *Acanthostomum* sp. da Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil (CHIOC) foram estudados: 36566, 36567, 38418, 32186 e 36565.

Dois espécimes foram examinados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Eles foram desidratados através de uma série de concentrações etílicas, seco em ponto crítico com dióxido de carbono, montado em stub de metal com fitas adesivas de carbono, revestido a ouro e, por fim, examinado a 15 kV em um Hitachi Stereoscan Modelo SU1510 (Hitachi Ltd., Tóquio, Japão). Vouchers serão depositados na CHIOC e na Colección Nacional de Helmintos, Universidad Nacional Autónoma de México (CNHE).

2.3. Análise molecular

2.3.1. Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

O DNA genômico foi isolado, individualmente, de três espécimes de *A. gnerii* usando o reagente DNazol (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio), seguindo as instruções do fabricante. A amplificação parcial do gene 28 rDNA foi realizada utilizando os primers 391: 5' -AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3' (Nadler e Hudspeth, 1998) e 536: 5' -CAGCTATCCTGAGGGAAAC-3' (García-Varela e Nadler, 2005). As condições de PCR foram as seguintes: 94 °C por 5 minutos (desnaturação inicial), seguido por 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto (desnaturação), 50°C por 1 minuto (anelamento), 72 °C por 1 minuto, e uma extensão pós-amplificação a 72°C por 10 minutos. Reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se dois primers internos, o 504 5'-CGTCTTGAAACACGGACTAAGG-3' (GARCÍA-VARELA e NADLER, 2005) e o 503 5'-CCTTGGTCCGTGTTTCAAGACG-3' (STOCK et al., 2001).

A região codificante da subunidade I da citocromo oxidase (*cox-1* mtDNA) foi amplificada usando os primers JB3 [5-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3] e JB4 [5-TAAAGAAAGAACATAAGTAAAATG-3] (BOWLES et al. 1992). O volume final da reação de PCR foi de 25 µl, sendo 2,5 µl de tampão de reação menos Mg (10X), 1,5 µl of MgCl₂ (50 mM), 1, 5 µl of dNTP's (2.5 mM), 1.5 µl de cada primer (10 mM), 0.25 µl de Platinum Taq DNA polymerase (5 U/µl), 14.25 µl de H₂O e 2 µl de DNA genômico. As amostras foram colocadas no termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf) e submetidas ao parâmetro de amplificação proposto por Utuk e Piskin (2012).

O gene alvo foi escolhido de acordo com os dados disponíveis no GenBank. 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.

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 Instituto de Biologia da Universidad Nacional Autónoma de México, como segue 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*) da UFRRJ.

2.3.2. Análise filogenética

As sequências obtidas neste estudo e as obtidas no GenBank foram alinhadas usando o algoritmo E-INS-I do programa MAFFT (KATOHI; STANDLEY 2013) implementado no GeneiousTM versão 8.1.4. Os alinhamentos foram analisados pelos métodos de Inferência Bayesiana (BI) e Máxima Verossimilhança (ML) empregando o modelo de substituição de nucleotídeos que foi calculado no programa jModelTest v2.1.10 (DARRIBA et al., 2012). Para a análise 28S rDNA, o modelo de substituição de nucleotídeos foi GTR + I + G. Árvore de BI foi construída usando MrBayes ver. 3.2 (RONQUIST et al. 2012) executando dois MC3 independentes de 4 cadeias (uma fria, três aquecida) por 5 milhões de gerações (ngen = 5.000.000), topologias de árvore de amostragem a cada 1.000 geração (samplefreq = 1.000) e as primeiras 500 amostras foram descartados como burn-in (burninfrac = 0,10). Tracer v.1.6 (RAMBAUT et al. 2014) foi usado para verificar a convergência e a mistura de diferentes parâmetros e para confirmar que o tamanho efetivo da amostra (ESS) de cada parâmetro era adequado para fornecer estimativas razoáveis da variância nos parâmetros do modelo (ie Valores de ESS > 200). O opistorquídeo *Opisthorchis noverca* (KC295443) foi usado como grupo externo para análise de 28S rDNA. A sequência obtida neste estudo foi alinhada com sequências do GenBank (ver tabela 1).

Tabela 1. Digenéticos usados na análise filogenética (28S rDNA) com o número de acesso do GenBank, hospedeiro, localização geográfica e referência bibliográfica dos isolados.

Espécie	Família	Hospedeiro	Localidade	Genbank Número de acesso	Referência
<i>Acanthochoasmus burminis</i>	Cryptogonimidae	<i>Xenochrophis piscator</i>	Tailândia	KC489791	Kvach et al., 2018
<i>Acanthostomum gnerii</i>	Cryptogonimidae	<i>Rhamdia quelen</i>	Brasil	-	Presente estudo
<i>Adlardia novaecaledoniae</i>	Cryptogonimidae	<i>Nemipterus furcosus</i>	Nova Caledonia	FJ554632	Miller et al., 2009
<i>Beluesca littlewoodi</i>	Cryptogonimidae	<i>Plectorhinchus gibbosus</i>	Austrália	EF566867	Miller e Cribb, 2007a
<i>Caecincola parvulus</i>	Cryptogonimidae	<i>Micropterus salmoides</i>	EUA	AY222231	Olson et al 2003
<i>Caulanus thomasi</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus bohar</i>	Austrália	EF428144	Miller and Cribb, 2007a
<i>Centrovarium marinum</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus</i> sp.	Austrália	HM056037	Miller et al., 2010
<i>Chelediadema marjoriae</i>	Cryptogonimidae	<i>Diagramma labiosum</i>	Austrália	EF566866	Miller e Cribb, 2007b
<i>Gynichthys diakidnus</i>	Cryptogonimidae	<i>Plectorhinchus gibbosus</i>	Austrália	FJ907333	Miller e Cribb, 2009
<i>Latuterus maldivensis</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus bohar</i>	Austrália	EF428146	Miller e Cribb, 2007b
<i>Latuterus tkachi</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus bohar</i>	Austrália	EF428145	Miller e Cribb, 2007b
<i>Lobosorchis polygongylus</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus gibbus</i>	Maldivas	FJ154902	Miller et al., 2009
<i>Metadena lutiani</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus bohar</i>	Austrália	KF417630	Miller e Cribb, 2013
<i>Mitotrema anthostomatum</i>	Cryptogonimidae	<i>Cromileptes altivelis</i>	EUA	AY222229	Olson et al., 2003
<i>Neoparacryptogonimus ovatus</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus carponotatus</i>	Austrália	EF116616	Miller e Cribb, 2007c
<i>Pseudosellacotyla lutzi</i>	Cryptogonimidae	<i>Hoplais malabaricus</i>	Brasil	MH368357	Pantoja et al., 2018
<i>Retrovarium amplorificium</i>	Cryptogonimidae	<i>Symphorus nematophorus</i>	Austrália	EF116609	Miller e Cribb, 2007c
<i>Siphoderina vinalwardsii</i>	Cryptogonimidae	<i>Sciaenops ocellatus</i>	EUA	AY222230	Olson et al., 2003
<i>Siphoderina grunnius</i>	Cryptogonimidae	<i>Plectorhinchus gibbosus</i>	Austrália	EU571261	Miller e Cribb, 2008
<i>Siphoderina manilensis</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus vitta</i>	Austrália	HM056035	Miller et al., 2010a
<i>Siphomutabilus gurukun</i>	Cryptogonimidae	<i>Caesio caerulaurea</i>	Austrália	KF417631	Miller e Cribb, 2013
<i>Timoniella imbutiforme</i>	Cryptogonimidae	<i>Atherina boyeri</i>	França	MF491865	Kvach et al., 2018

<i>Varialvus charadrus</i>	Cryptogonimidae	<i>Lutjanus vitta</i>	Austrália	HM187778	Miller et al., 2010a
<i>Opistorchis noverca</i>	Suidae	<i>Sus scrofa domestica</i>	Índia	KC295443	Tandon et al., 2013

3. Resultados

Digenéticos encontrados no presente estudo foram identificados como *Acanthostomum gnerii* após análise morfológica através das observações de microscopia de luz e eletrônica de varredura e após comparação com espécimes depositados na CHIOC. A contagem dos espinhos na ventosa oral variou entre os espécimes encontrados no presente estudos (20 - 23) e foi observado apenas um ceco intestinal. Detalhes dos espinhos ao longo da superfície do corpo foram observados com maiores detalhes.

A prevalência de *A. gnerii* foi de 10% (10 peixes examinados, um infectado com 5 digenéticos). Uma sequência de 28s rDNA e duas sequências de *cox1* foram geradas de espécimes coletados no rio Marapanim, Igarapé-açu, Pará, Brasil. O alinhamento final de 28S rDNA consistiu de 914 pares de bases e incluiu sequências de 32 espécies da família Cryptogonimidae. Duas sequências de *cox1* mtDNA foram disponibilizadas.

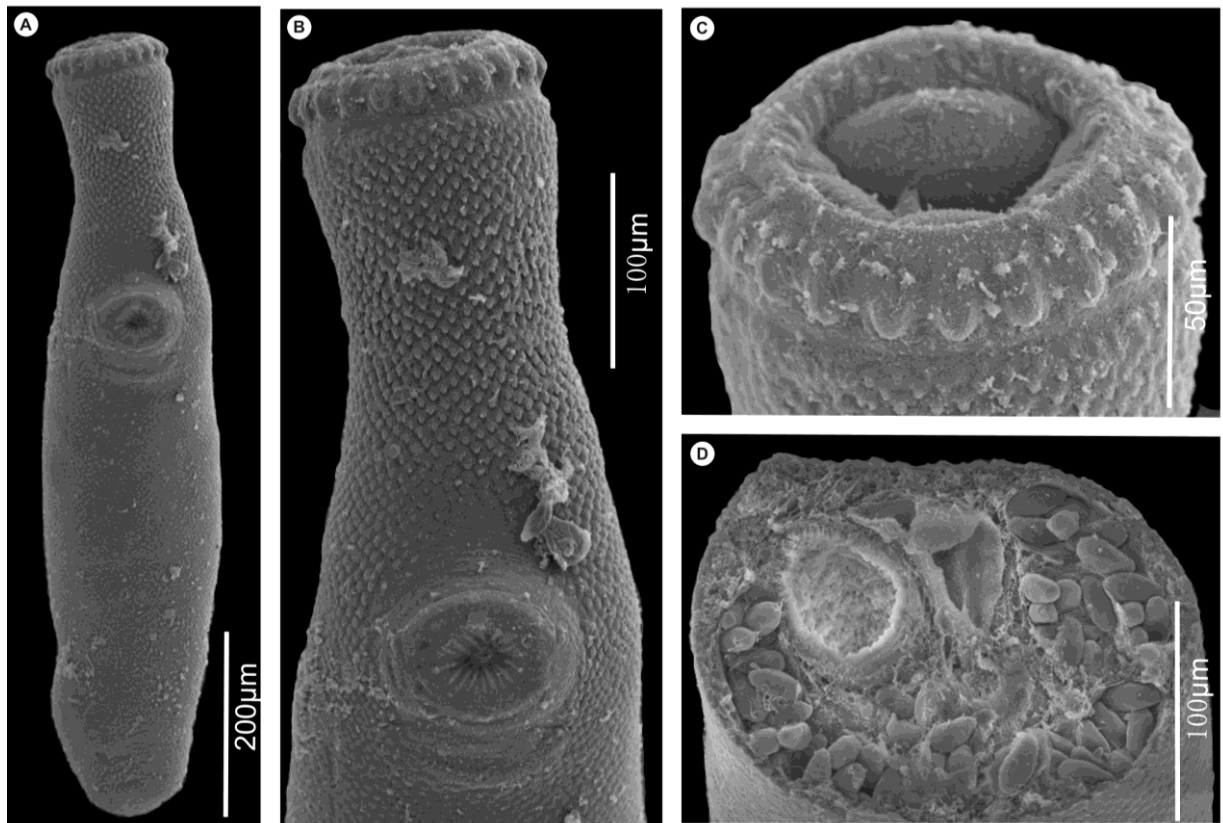


Figura 1. Micrografias de *Acanthostomum gnerii* Szidat, 1954 coletado em *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), Brasil (A–D). **A**, vista ventral; **B**, extremidade anterior mostrando os espinhos no tegumento e o acetábulo; **C**, ventosa oral cercada por espinhos; **D**, corte transversal ao meio do corpo; ovos.

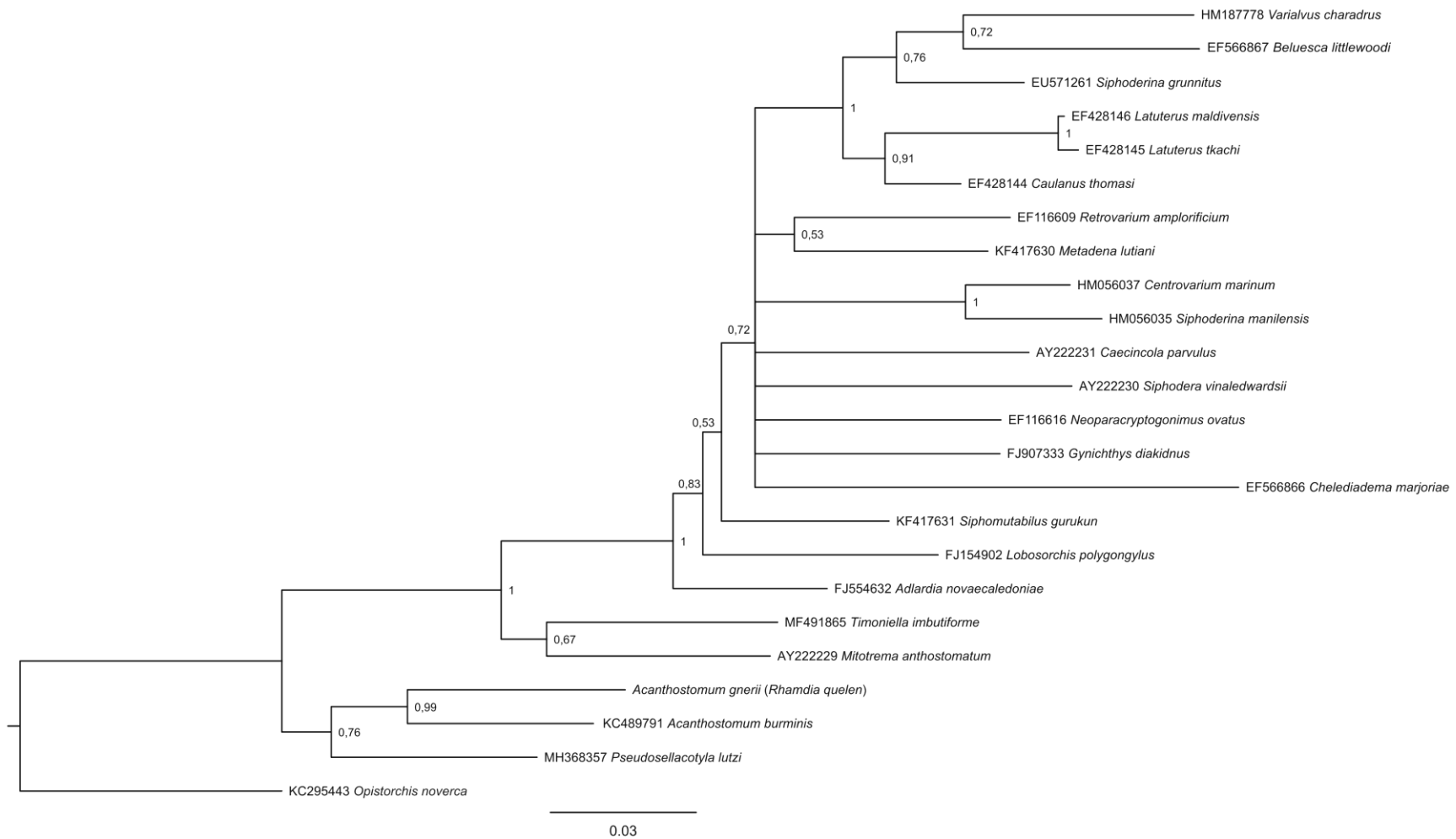


Figura 2. Árvore bayesiana da análise filogenética de 28S rDNA de criptogonimídeos. O número representa o suporte dos ramos pela probabilidade posterior (4×10^6 generations; burn-in = 4×10^3). *Opistorchis noverca* foi usado como grupo externo.

4. Discussão

Todos os caracteres morfológicos fundamentais sendo muito parecidos com espécimes estudados por Lunaschi (1986) e Martins et al., (2016).

A contagem dos espinhos na ventosa oral variou entre os espécimes encontrados no presente estudos (20 e 23), enquanto nos espécimes estudados na descrição por Szidat (1969) variou entre 21 e 23, os estudados por Lunaschi (1986) variou entre 19 e 23, os estudados por Kohn e Froés variou entre 20 e 24 e os estudados por Martins et al., (2016) variou entre 23 e 24.

Nossas observações revelaram fileiras de espinhos serrilhados distribuídos por toda a superfície corporal. Detalhes dos espinhos muito parecidos com os encontrados no cryptogonimídeo *Aphallus tubarium* (Rodolphi, 1819) Poche, 1926 parasito do sparídeo *Dentex dentex* como relatou Antonelli et al., (2014). Os espinhos diminuem em densidade da parte anterior para a posterior em nossos espécimes, assim como já havia sido relatado anteriormente em outras espécies de *Acanthostomum* (TKACH; SYDER, 2003; IBRAHEEM, 2006). Nossas micrografias não permitem afirmar se os espinhos diminuem ou se mantém o mesmo tamanho ao longo do corpo, condição que varia entre alguns cryptogonimídeos.

O ceco intestinal é outra característica morfológica que merece atenção no estudo desta espécie. Szidat (1954) descreveu *A. gnerii* com dois cecos intestinais, e assim foi caracterizado também por outros autores, posteriormente (CABALLERO; BRENES, 1958; KOHN; FRÓES, 1968). Lunaschi (1986) redescreveu a espécie e observou apenas um ceco intestinal. Em estudo baseado no ciclo de vida, Ostrowski de Nuñez e Gil de Pertierra (1991) observaram que as metacercárias da espécie apresentavam um ceco bem desenvolvido e outro atrofiado, e as metacercárias com mais de 45 dias pós-infecção, o ceco atrofiado não foi mais observado. E todos os adultos analisados apresentaram um ceco completamente atrofiado. Nossos espécimes possuem apenas um ceco intestinal corroborando com a redescrição da espécie.

A análise molecular de 28S rDNA alinhou nosso espécime de *Acanthostomum gnerii* com *Acanthostomum bumini*, mostrando similaridade de 93% com esta espécie coletada em serpente *Xenochrophis piscator* na Tailândia. Análise filogenética de *cox1* não foi realizada por conta do baixo número de sequências representativas no GenBank. Ainda sim, são sequências bastante relevantes para estudos futuros que possam vir comparar a variação intraespecífica desta espécie de ampla distribuição geográfica.

Nossa análise mostra a monofilia do gênero *Acanthostomum* corroborando com os achados de Martínez-Aquino et al. (2017). Esses autores realizaram a análise filogenética com táxons representando 24 gêneros mostrando a relação de *Acanthostomum* com outros criptogonimídeos, e seus resultados, assim como os encontrados por Pantoja et al., (2018) mostram que subfamília Acanthostominae é parafilética. Análise molecular ainda é escassa para boa parte dos táxons dentro da família Cryptogonimidae e a inclusão de mais táxons se faz necessário para compreender melhor a classificação do grupo.

Os registros de *Acanthostomum gnerii* com *R. quelen* faz com que seja um bom modelo de prospecção molecular visando saber se é apenas uma espécie ou um complexo, visto que há registros de espécies crípticas dentro de Cryptogonimidae (MILLER; CRIBB, 2007b; MILLER et al., 2010b; RAZO-MENDIVIL et al., 2015)

Em conclusão, o nosso trabalho representa o primeiro estudo molecular (28S rDNA e *cox1* mtDNA) combinado com a análise morfológica de *Acanthostomum gnerii* na América do Sul. Informações adicionais deste cryptogonimídeo de outras localidades

são necessárias para compreender melhor a biogeografia e filogenia do mesmo. Os registros de *Acanthostomum gnerii* com *R. quelen* faz com que seja um bom modelo de prospecção molecular visando saber se é apenas uma espécie ou um complexo, visto que há registros de espécies crípticas dentro de Cryptogonimidae (MILLER; CRIBB, 2007b; MILLER et al., 2010b; RAZO-MENDIVIL et al., 2015)

Em conclusão, o nosso trabalho representa o primeiro estudo molecular (28S rDNA e *cox1* mtDNA) combinado com a análise morfológica de *Acanthostomum gnerii* na América do Sul. Informações adicionais deste cryptogonimídeo de outras localidades são necessárias para compreender melhor a biogeografia e filogenia do mesmo

5. Referências Bibliográficas

ANTONELLI, L.; QUILICHINI, Y.; FOATA, J.; MARCHAND, B. Topography and ultrastructure of the tegument of *Aphallus tubarium* (Rodolphi, 1819) Poche, 1926 (Digenea: Cryptogonimidae), intestinal parasite of the common *Dentex dentex* (Linnaeus 1758) from Valinco Gulf. **Acta Parasitologica**, v. 59, n. 4, p. 615-624, 2014.

CHOUHDURY, A.; AGUIRRE-MACEDO, M. L.; CURRAN, S. S.; OSTROWSKI DE NUÑEZ, M., OVERSTREET, R. M.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; et al. Trematode diversity in freshwater fishes of the Globe II: 'New World'. **Systematic Parasitology**, v. n. 93, p. 271–282, 2016.

CORREA, R. S. S.; BRASIL-SATO, M. C. Digenea in the surubim *Pseudoplatystoma corruicans* (Spix & Agassiz, 1829) (Siluriformes: Pimelodidae) of the upper São Francisco river, State of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1181–1185, 2008.

GIL DE PERTIERRA, A. A.; OSTROWSKI DE NUÑEZ, M. Ocurrencia estacional de *Acanthostomum gnerii* Szidat, 1954 (Acanthostomidae, Acanthostominae) y de dos especies de Derogenidae, Halipegidae, parásitos del bagre sapo *Rhamdia sapo* Valenciennes, 1840 (Pisces, Pimelodidae) em Argentina. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 55, p. 305–314, 1995.

IBRAHEEM, M. H. On the morphology of *Acanthostomum spiniceps* (Looss, 1896) and *A. absconditum* (Looss, 1901) (Digenea: Cryptogonimidae: Acanthostominae) with particular reference to the juvenile stage. **Acta Zoologica**, 87, p. 159-169, 2006.

KVACH, Y.; BRYJOVÁ, A.; SASAL, P.; WINKLER, H. M. 2018. The taxonomic and phylogenetic status of digeneans from the genus *Timoniella* (Digenea: Cryptogonimidae) in the Black and Baltic seas. **Journal of Helminthology**, v. 92, n. 5, p. 1–8, 2018.

LAMOTHE-ARGUMEDO, R ; PONCIANO-RODRIGUEZ, G. Estudio helmintológico de los animales silvestres de la estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz. Trematoda III. Redescrípcion de *Stunkardiella minima* (Stunkard, 1938) Lamothe y Ponciano, 1985. Anales del Instituto. Biológico de la Universidad. Nacional. **Autonoma del México Serie Zoología**, v. 56, p. 323–336, 1985.

LUNASCHI, L. Helmintos parasitos de peces da Água Dulce de la Argentina. V. Redescrípcion de *Acanthostomum (Atrophocaecum) gnerii* (sic) Szidat 1954 (Trematoda: Acanthostomidae). **Neotropica**, v. 32, p. 35–42, 1986.

MARTINS, M. L.; TANCREDO, K. R.; MARCHIORI, N. C.; PEREIRA JÚNIOR, J.; DE CASTRO, L. A. S.; GARCIA, P.; ESQUÍVEL, J. *Acanthostomum gnerii* Szidat, 1954 (Digenea: Cryptogonimidae) de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Neotropical Helminthology**, v. 10, n. 2, p. 189–203, 2016.

MILLER, T. L.; CRIBB, T. H. *Gynichthys diakidnus* n. g., n. sp. (Digenea: Cryptogonimidae) from the grunt *Plectorhinchus gibbosus* (Lacépède, 1802) (Perciformes: Haemulidae) off the Great Barrier Reef, Australia. **Systematic Parasitology**, v. 74, n. 2, p. 103–112, 2009.

MILLER, T. L.; ADLARD, R. D.; BRAY, R. A.; JUSTINE, J. L.; CRIBB, T. H. Cryptic species of *Euryakaina* n.g. (Digenea: Cryptogonimidae) from sympatric lutjanids in the Indo-West Pacific. **Systematic Parasitology**, v. 77, n. 3, p. 185–204, 2010a.

MILLER, T. L.; BRAY, R. A.; JUSTINE, J. L.; CRIBB, T. H. *Varialvus* gen. nov. (Digenea, Cryptogonimidae), from species of Lutjanidae (Perciformes) off the Great Barrier Reef, New Caledonia and the Maldives. **Acta Parasitologica**, v. 55, n. 4, p. 327–339, 2010b.

MILLER, T. L.; CRIBB, T. H. Two new cryptogonimid genera *Beluesca* n. gen. and *Chelediadema* n. gen. (Digenea: Cryptogonimidae) from tropical Indo-West Pacific Haemulidae (Perciformes). **Zootaxa**, v. 1543, p. 45–60, 2007a.

MILLER, T. L.; CRIBB, T. H. Two new cryptogonimid genera (Digenea, Cryptogonimidae) from *Lutjanus bohar* (Perciformes, Lutjanidae): Analyses of ribosomal DNA reveals wide geographic distribution and presence of cryptic species. **Acta Parasitologica**, v. 52, n. 2, p. 104–113, 2007b.

MILLER, T. L.; DOWNIE, A. J.; CRIBB, T. H. Morphological disparity despite genetic similarity; new species of *Lobosorchis* Miller & Cribb, 2005 (Digenea: Cryptogonimidae) from the Great Barrier Reef and the Maldives. **Zootaxa**, v. 1992, p. 37–52, 2009.

MILLER, T. L.; CRIBB, T. H. Dramatic phenotypic plasticity within species of *Siphomutabilus* n. g. (Digenea: Cryptogonimidae) from Indo-Pacific caesionines (Perciformes: Lutjanidae). **Systematic Parasitology**, v. 86, n. 2, p. 101–112, 2013.

MILLER, T. L.; CRIBB, T. H. Coevolution of *Retrovarium* n. gen. (Digenea: Cryptogonimidae) in Lutjanidae and Haemulidae (Perciformes) in the Indo-West Pacific. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 8–9, p. 1023–1045, 2007c.

OLSON, P. D.; CRIBB, T. H.; TKACH, V. V.; BRAY, R. A.; LITTLEWOOD, D. T. J. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 7, p. 733–755, 2003.

OSTROWSKI DE NUÑEZ, M; GIL DE PERTIERRA, A. The life history of *Acanthostomum gnerii* Szidat 1954 (Trematoda: Acanthostomidae), from the catfish *Rhamdia sapo* in Argentina. **Zoologischer Anzeiger**, v. 227, p. 58–71. 1991.

PANTOJA, C. S.; HERNÁNDEZ-MENA, D. I.; DE LEÓN, G. P. P.; LUQUE, J. L. 2018. Phylogenetic position of *Pseudosellacotyla lutzii* (Freitas, 1941) (Digenea: Cryptogonimidae), a parasite of *Hoplias malabaricus* (Bloch) in South America, through 28S *rDNA* sequences, and new observations of the ultrastructure of their tegument. **The Journal of Parasitology**, v. 104, n. 5, 530–538.

PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A.; DOADRIO, I. Evolutionary history of genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, 172–189, 2002.

SZIDAT, L. 1954. Trematodes nuevos de peces de agua dulce de la Republica Argentina y um intento para aclarar su origen marino. **Revista del Instituto Nacional de Investigacion de las Ciencias Naturales**, v. 1, p. 1-85.

TKACH, V. V.; SNYDER, S. D. *Acanthostomum macroclemys* n. sp. (Digenea: Cryptogonimidae: Acanthostominae) from the alligator snapping turtle, *Macrolemys temmincki*. **Journal of Parasitology** v. 89, n. 1, p. 159–167, 2003.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Cladorchiidae passa a ser a família com maior número de táxons na América do Sul após a descrição de seis novas espécies no presente estudo. Nossos resultados evidenciam o quanto esse grupo ainda pode ser explorado, apesar de todos os esforços feitos até o presente momento. A presente análise permitiu observar a primeira estrutura filogenética e posições sistemáticas de vários táxons, porém estudos futuros fornecerão novas informações que irão contribuir para nossa compreensão do grupo e nos permitirá desenvolver uma classificação mais natural das subfamílias.
- Estudos de cladorquídeos 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.
- A importância de estudar os espécimes depositados em coleções helmintológicas para a correção e/ou complementação de informações sobre um determinado táxon foi evidenciada.
- A ampla distribuição geográfica dos criptogonimídeos encontrados no presente estudo faz com que ambas as espécies sejam bons modelos para estudos de prospecção molecular. Pesquisas futuras podem revelar se essas espécies são únicas ou são complexos de espécies crípticas.
- O presente estudo apresenta grande contribuição no fornecimento de dados moleculares, morfológicos e de relações parasito/hospedeiro de cladorquídeos e criptogonimídeos. Atualmente, estudos relacionados à taxonomia de digenéticos são extremamente escassos na América do Sul. Diante tamanha diversidade de hospedeiros que ocorrem na região, novos estudos devem ser realizados para ampliar o conhecimento do grupo.

New genera and species of paramphistomes (Digenea: Paramphistomoidea: Cladorchiidae) parasitic in fishes from the Amazon basin in Peru

Camila Pantoja · Tomáš Scholz  · José Luis Luque · Arlene Jones

Received: 29 January 2018 / Accepted: 19 June 2018
© Springer Nature B.V. 2018

Abstract Two new genera and three new species of paramphistomoid digeneans are described in the family Cladorchiidae Fischeoeder, 1901 from doradid, heptapterid, pimelodid and pseudopimelodid fishes in the Amazon River in Peru. *Goeldamphistomum amazonum* n. g., n. sp. (type-species) from *Goeldiella eques* (Müller & Troschel) (type-host) and *Tenellus trimaculatus* (Boulenger), and *Goeldamphistomum peruanum* n. g., n. sp. from *Duopalatinus peruanus* Eigenmann & Allen (type-host), *Calophysus macropterus* (Lichtenstein) and *Microglanis* sp. are placed in the Dadayiinae Fukui, 1929. Both species have an accessory acetabular sucker, which distinguishes the

genus from all taxa previously reported from South American freshwater fishes. They differ from each other primarily in that *G. amazonum* has a prebifurcal genital pore and oblique, separated testes, the levels of which rarely overlap longitudinally, whereas *G. peruanum* has a postbifurcal genital pore and testes directly to obliquely tandem. *Iquitostrema papillatum* n. g., n. sp. (Kalitrematinae Travassos, 1933) from the intestine of *Hassar orestis* (Steindachner) differs from other members of the subfamily in the combination of a massive acetabulum with a papillate luminal surface and symmetrical testes which overlie the caeca close to the caecal arch. These are the first records of paramphistomes from the five host species studied here.

This article was registered in the *Official Register of Zoological Nomenclature* (ZooBank) as urn:lsid:zoobank.org:pub:F18E02DA-F8ED-49D3-87BE-2E252612C18C. This article was published as an Online First article on the online publication date shown on this page. The article should be cited by using the doi number. This is the Version of Record.

This article is part of the Topical Collection Digenea.

C. Pantoja · J. L. Luque
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ),
Seropédica, RJ CEP 23851-970, Brazil

T. Scholz (✉)
Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech
Academy of Sciences, Branišovská 31,
370 05 České Budějovice, Czech Republic
e-mail: tscholz@paru.cas.cz

Introduction

The Amazon River basin is a biodiversity hot spot with an extraordinarily rich fauna of freshwater fishes

J. L. Luque
Departamento de Parasitologia Animal, UFRRJ, Caixa
Postal 74.540, Seropédica, RJ CEP 23851-970, Brazil

A. Jones (✉)
Creigiau Llwydion, Heol y Maes, Coelbren,
Neath SA10 9PT, UK
e-mail: arlene.jones1@btinternet.com

Journal of Parasitology

Phylogenetic position of *Pseudodilaeocotyle lutzii* (Frobas, 1941) (Digenea: Cryptogonimidae), a parasite of *Hoplias malabaricus* (Bloch) in South America, through 28S rDNA sequences, and new observations of the ultrastructure of their tegument
 –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	17-201R2
Full Title:	Phylogenetic position of <i>Pseudodilaeocotyle lutzii</i> (Frobas, 1941) (Digenea: Cryptogonimidae), a parasite of <i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch) in South America, through 28S rDNA sequences, and new observations of the ultrastructure of their tegument
Short Title:	Phylogenetic position of <i>Pseudodilaeocotyle lutzii</i>
Article Type:	Regular Article
Corresponding Author:	Gerardo Perez-Ponce de Leon, Dr. Universidad Nacional Autónoma de México Mexico, D.F. MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidad Nacional Autónoma de México
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Camille S. Pantja, MSc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Camille S. Pantja, MSc David Ivan Hernández-Mena, MSc Gerardo Perez-Ponce de Leon, Dr. Jose Luis Luque, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	The freshwater fish digenean <i>Pseudodilaeocotyle lutzii</i> (Frobas, 1941) Yamaguti, 1954 has had an unsettled taxonomic history, and has at various times been classified as a member of Nanophyetidae, Heterophyidae, Microphallidae, Faustulidae, and Cryptogonimidae. Nine individual specimens of the trahira, <i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch, 1794), were sampled in the Paraná River basin, Paraná State, Brazil; twenty-two specimens of <i>P. lutzii</i> were collected. One specimen of <i>P. lutzii</i> was used to obtain a sequence of the domains D1-D3 of the 28S rRNA gene, and to perform a phylogenetic analysis to assess their position and classification within Plagiorchiida. The resulting tree unequivocally shows that the species, along with acanthostomines belong to the Cryptogonimidae, corroborating recent findings based on the morphology of the cercariae, and in the characteristics of the life cycle. In addition, the study of the ultrastructure of the tegumental spines through scanning electron microscopy (SEM), allowed us to characterize them as pedinate spines possessing 3 to 8 digitiform projections at their distal end, and extending from the anterior to the posterior extremity of the body. This study also provides the first molecular data for a cryptogonimid from South America.