

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Parasitária

**ESTUDO MORFOLÓGICO DE *SYNTHESIUM PONTOPORIAE* (RAGA,
AZNAR, BALBUENA E DAILEY, 1994) N. COMB. (DIGENEA: CAMPULIDAE)
E ANÁLISE DE GENES NUCLEARES E MITOCONDRIAIS**

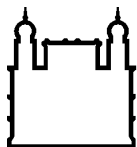
JULIANA MARIGO

RIO DE JANEIRO
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

JULIANA MARIGO

ESTUDO MORFOLÓGICO DE *SYNTHESIUM PONTOPORIAE* (RAGA, AZNAR, BALBUENA E DAILEY, 1994) N. COMB. (DIGENEA: CAMPULIDAE) E ANÁLISE DE GENES NUCLEARES E MITOCONDRIAIS

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

Orientadoras: Prof. Dr. Cláudia Portes Santos
Prof. Dr. Ana Carolina Paulo Vicente

RIO DE JANEIRO
2009

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

M335

Marigo, Juliana.

Estudo morfológico de *Synthesium pontoporiae* (Raga, Aznar, Balbuena e Dailey, 1994) n. comb. (Digenea: Brachycladidae) e análise de genes nucleares e mitocondriais / Juliana Marigo. – Rio de Janeiro, 2009.

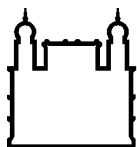
x, 86 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2009.

Bibliografia: f. 74-86

1. *Synthesium pontoporiae*. 2. *Synthesium tursionis*. 3. *Synthesium seymouri*. 4. *Pontoporia blainvillei*. 5. Taxonomia. 6. Genética I. Título.

CDD 576.64



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em

Juliana Marigo

**ESTUDO MORFOLÓGICO DE *SYNTHESIUM PONTOPORIAE* (RAGA,
AZNAR, BALBUENA E DAILEY, 1994) N. COMB. (DIGENEA: CAMPULIDAE)
E ANÁLISE DE GENES NUCLEARES E MITOCONDRIAIS**

**ORIENTADORAS: Prof. Dr. Cláudia Portes Santos
Prof. Dr. Ana Carolina Paulo Vicente**

Aprovada em: 10/06/2009

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Alexandre Afranio Peixoto - Presidente
Prof. Dr. José Luis Fernando Luque Alejos
Prof. Dr. Eduardo Resende Secchi

Rio de Janeiro, 10 de junho de 2009.

Ao direito de existir de todas as formas de vida
e aos seres humanos que se dedicam a preservá-lo
porque realmente se importam.

Agradecimentos

Primeira e eternamente aos meus pais, Dolores e João por sempre terem me apoiado nesta carreira, mesmo que isso implicasse em muitas ausências e saudades.

As minhas orientadoras, Cláudia e Ana Carolina, por terem tornado meu projeto possível de ser realizado e por tudo que aprendi nestes quatro anos. A Cláudia por ter me aceitado como aluna e por ter me treinado a enxergar estruturas nos parasitos que eu nem imaginava. A Ana Carolina por ter aceitado me apresentar o mundo maravilhoso da genética, por confiar que eu era esperta o suficiente para aprender e me mostrar que não era um “bicho de sete cabeças”. Obrigada!

Sempre serei grata as equipes do LAPSA e LGMM por toda ajuda e ensinamentos.

Obrigada a todas as instituições e pesquisadores que colaboraram com amostras permitindo a realização deste projeto e apoiando esta idéia. Agradecimento especial às amigas “genéticas” Larissa Oliveira e Haydée Cunha por terem me introduzido ao mundo dos haplótipos e afins, abrilhantando meu projeto.

À minha família e amigos, em especial às eternas “BioPescas”: Valeria Ruoppolo, Carolina Bertozzi, Janaina Ribeiro, Juliana Viotto, Barbara Henning pela amizade e apoio mesmo que a distância. Ao Nei por estar sempre comigo mesmo longe.

Aos amigos no Rio de Janeiro, Silvia Bahadian, Daphne Wrobel, Isabel Freire, Nancy Orellana, Ana Cristina (Titi)... Às famílias Bahadian Moreira e Freire que me acolheram com tanto carinho, em especial á Dona Lourdes por toda sua atenção. Às amigas do Sion, em especial à Claudia Mora pela companhia e amizade de sempre.

A Pós Graduação em Biologia Parasitária e ao Instituto Oswaldo Cruz pela bolsa concedida e uso das Plataformas de Microscopia Confocal (LABPAT/IOC) e Genômica de Seqüenciamento de DNA/PDTIS.

Índice

1. Introdução	1
1.1.O hospedeiro: <i>Pontoporia blainvillei</i> (Gervais & d’Orbigny, 1844) (Cetacea, Pontoporiidae).....	1
1.2. O parasito: Brachycladiidae (Digenea) Odhner, 1905.....	4
1.3. O parasito como marcador biológico.....	6
1.4. Ciclo evolutivo de trematódeos marinhos.....	8
1.5. Estudo da Relação Parasito-Hospedeiro.....	9
1.6. Genoma de Digenea.....	10
2. Objetivos	12
2.1. Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. Resultados	13
3.1. Artigo 1: Marigo J, Vicente ACP, Valente ALS, Measures L, Santos CP. Redescription of <i>Synthesium pontoporiae</i> n. comb. with notes on <i>S. tursionis</i> and <i>S. seymouri</i> n. comb. (Digenea: Brachycladiidae Odhner, 10905). J. Parasitol. 2008; 94(2):505-514.....	13
3.2. Artigo 2: Marigo J, Iñiguez AM, Thompson CC, Santos CP, Vicente ACP. The <i>Synthesium</i> genetic relationship within Brachycladiidae Odhner, 1905 (Digenea) based on nuclear and mitochondrial genes. (Submetido ao International Journal for Parasitology. 2009).....	23
3.3. Artigo 3: Marigo J, Cunha HA, Bertozzi CP, Souza SP, Rosas FCW, Oliveira MR, Cremer MJ, Barreto AS, Oliveira L, Capozzo L, Valente ALS, Santos CP, Vicente ACP. ITS, ND3 and COI of <i>Synthesium pontoporiae</i> (Digenea, Brachycladiidae) in prospecting for stock differentiation of their host, the endangered dolphin <i>Pontoporia blainvillei</i> (Pontoporiidae). (Em submissão 2009).....	42
4. Discussão	61
5. Conclusões	73
6. Referências bibliográficas	74

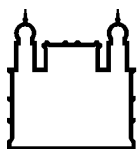
Tabela

Tabela 1.3: Comparação das espécies de helmintos gastrointestinais encontradas em espécimes de *Pontoporia blainvillei* provenientes dos estados de São Paulo (Áreas 1, 2 - SP), Paraná (Área 3 - PR) e Rio Grande do Sul (RS), Brasil, e do Uruguai e Argentina*.....

7

Lista de Figuras

Figura 1.1.1 a): Três exemplares de <i>Pontoporia blainvillei</i> registrados na Baía de Babitonga, São Francisco do Sul, SC. Foto: Marta Cremer. b) Exemplar acidentalmente capturado por pesca artesanal no litoral de São Paulo. Foto: Projeto BioPesca.....	1
Figura 1.1.2: Mapa das áreas de manejo, Franciscana Management Areas (“FMAs”), baseadas em diferentes níveis de capturas acidentais. Fonte: Secchi <i>et al</i> , 2002.....	3
Figura 1.4.1: Esquema do ciclo de vida geral de trematódeos no ambiente marinho.....	8



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO MORFOLÓGICO DE *SYNTHESIUM PONTOPORIAE* (RAGA, AZNAR, BALBUENA E DAILEY, 1994) N. COMB. (DIGENEA: CAMPULIDAE) E ANÁLISE DE GENES NUCLEARES E MITOCONDRIAIS

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Juliana Marigo

Pontoporia blainvillei (Gervais and d'Orbigny, 1844) é um pequeno cetáceo endêmico da América do Sul ameaçado de extinção. O papel do parasito intestinal *Synthesium pontoporiae* (Raga, Aznar, Balbuena and Dailey, 1994) n. comb. (Digenea: Brachycladiidae) como possível marcador biológico para diferenciar os estoques de *P. blainvillei* ao longo da costa sudeste e sul do continente sulamericano foi avaliado usando amostras coletadas entre 1997 e 2006. Os objetivos incluíram a redescrição taxonômica de *S. pontoporiae* n. comb., sua caracterização genética, comparação morfológica entre *S. pontoporiae*, *Synthesium tursionis* (Marchi, 1873) n. comb. e *Synthesium seymouri* (Price, 1932) n. comb. e avaliação das variações morfo-genéticas de *S. pontoporiae* n. comb. nas diferentes áreas de coleta. Nos resultados, novas combinações foram propostas com *S. pontoporiae* n. comb., *S. tursionis* n. comb. e *S. seymouri* n. comb. redescritos e diferenciados. *Synthesium pontoporiae* n. comb. é caracterizada por ter razão entre ventosas de 1:1.5-3.0, testículo oval a lobado, cirro com porção proximal piriforme e distal tubular e vitelinos em forma de pequenos folículos dispostos entre a vesícula seminal e a extremidade posterior do corpo. Não foi possível observar variações morfológicas que indicassem prováveis estoques de *S. pontoporiae* n. comb. Considerando o gene 18S RNAr, *S. pontoporiae* n. comb. e *S. tursionis* n. comb. estão geneticamente relacionados aos Brachycladiidae. O gene ND3 DNAmT de *S. pontoporiae* n. comb. estabelece a relação do gênero com o sítio de infecção, separando brachycladiídeos intestinais dos extra-intestinais. As regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 de *S. pontoporiae* n. comb. não apresentaram variabilidade intraespecífica. As sequências dos genes mitocondriais ND3 e COI DNAmT de *S. pontoporiae* n. comb. indicaram um cenário de expansão populacional que coincide com o período de glaciações. Considerando os dados morfológicos, as regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 e os genes ND3 e COI DNAmT de *S. pontoporiae* n. comb. não foram encontradas evidências de estruturação populacional coerente com os estoques de *P. blainvillei*.

ABSTRACT

Pontoporia blainvillei (Gervais and d'Orbigny, 1844) is a small cetacean endemic to South America and endangered of extinction. The role of the intestinal parasite *Synthesium pontoporiae* n.comb. (Raga, Aznar, Balbuena and Dailey, 1994) (Digenea: Brachycladiidae) as a possible biological marker to differentiate *P. blainvillei* stocks along the south and southeastern coast of the south American continent was evaluated using samples collected from 1997 to 2006. The objectives included the taxonomic redescription of *S. pontoporiae* n. comb., its genetic characterization, the morphological comparison among *S. pontoporiae* n. comb., *Synthesium tursionis* (Marchi, 1873) n. comb. and *Synthesium seymouri* (Price, 1932) n. comb. and the evaluation of morfo-genetic variation of *S. pontoporiae* n. comb. in the distinct sampling areas. As results, new combinations were proposed for *S. pontoporiae* n. comb., *S. tursionis* n. comb. and *S. seymouri* n. comb. which were redescribed and differentiated. *Synthesium pontoporiae* n. comb. is characterized by the suckers ratio of 1:1.5-3.0, testes oval to lobed, a cirrus with pyriform proximal region and tubular distal one, and vitellarium in the form of small follicles situated between the level of the seminal vesicle and the posterior extremity of the body. It was not possible to observe morphological variation that could differentiate stocks of *S. pontoporiae* n. comb. Considering the 18 rRNA gene, *S. pontoporiae* n. comb. and *S. tursionis* n. comb. are genetically related to the Brachycladiidae. The ND3 mtDNA gene of *S. pontoporiae* n. comb. establishes the relation of the genus to the site of infection, separating the intestinal and extra-intestinal brachycladiids. The regions ITS1 and ITS2 of *S. pontoporiae* n. comb. did not present intraespecific variability. The mitochondrial gene sequences of ND3 and COI mtDNA of *S. pontoporiae* n. comb. indicated a population expansion scenery that coincides with the glaciations period. Considering the morphological data, the ITS1 and ITS2 regions and the ND3 and COI mtDNA of *S. pontoporiae* n. comb. no evidence of population structure in accordance with the stocks of *P. blainvillei* was found.

1. Introdução

1.1. O hospedeiro: *Pontoporia blainvillei* (Gervais e d'Orbigny, 1844) (Cetacea, Pontoporiidae).

O grupo pouco conhecido e ameaçado dos “golfinhos de rio” é constituído por odontocetos morfologicamente e filogeneticamente distinto dos golfinhos marinhos. É representado por quatro famílias que atualmente ocorrem somente na Ásia e na América do Sul (HAMILTON *et al.*, 2001). *Pontoporia blainvillei* (Gervais e d'Orbigny, 1844) é o único representante do grupo que habita águas costeiras. É um pequeno cetáceo vulgarmente conhecido como “toninha” ou “franciscana”, difícil de ser observado em ambiente natural devido a sua coloração críptica e hábitos: vivem em pequenos grupos (2-5 indivíduos), têm reduzido comportamento aéreo e não interagem com outros cetáceos ou embarcações (CREMER e SIMÕES-LOPES, 2005) (Figura 1.1.1a). Estudos de genética de população indicam uma estrutura social complexa, provavelmente matrilinear, com indivíduos com forte grau de parentesco dentro de um mesmo grupo (COSTA *et al.*, 2008a).

É a única espécie de golfinho que consta da Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (IBAMA, 1997) e provavelmente a espécie mais ameaçada no Atlântico Sul Ocidental devido a elevados índices de morte por captura acidental em redes de espera (OTT *et al.*, 2002) (Figura 1.1.1 b).



Figura 1.1.1a): Três exemplares de *Pontoporia blainvillei* registrados na Baía de Babitonga, São Francisco do Sul, SC. Foto: Marta Cremer. b) Exemplar acidentalmente capturado por pesca artesanal no litoral de São Paulo. Foto: Projeto BioPesca.

As “toninhas” ocorrem exclusivamente em águas costeiras do Atlântico Sul Ocidental entre o norte do Espírito Santo e a Península Valdez, no norte da Patagônia Argentina. Na região sudeste do Brasil, entre Macaé e Ubatuba, e entre Atafona e a foz do rio Doce parecem existir hiatos na distribuição geográfica da espécie (SICILIANO *et al.*,2002).

Com base em caracteres morfométricos e moleculares (DNAmt) foi proposta a existência de pelo menos duas populações de *P. blainvillei*, denominadas como "forma norte" e "forma sul", de acordo com sua distribuição ao norte ou sul de Santa Catarina (PINEDO, 1991; 1995; SECCHI, 1998). A forma sul vem sendo estudada há mais de 20 anos, levando a um maior acúmulo de conhecimento sobre a espécie e chegando a conclusão que as capturas acidentais estão causando um grande impacto e que as taxas de mortalidade podem não ser sustentáveis ao longo do tempo (SECCHI *et al.*,2003b). Já a forma norte é menos conhecida e de acordo com estudos mais recentes, menor ou em declínio, podendo necessitar atenção especial com relação a sua conservação (DI BENEDETTO *et al.*,1998; SECCHI *et al.*,1998, 2002; BERTOZZI e ZERBINI, 2002).

Estudos de manejo e conservação, destes mamíferos ameaçados de extinção, definem para a espécie quatro estoques ou áreas de manejo (“Franciscana Management Areas-FMAs”- SECCHI *et al.*,2003a). As áreas de manejo foram definidas com base em genética, morfologia, parâmetros populacionais e ecológicos: FMAI- Espírito Santo e Rio de Janeiro; FMAII- São Paulo, Paraná e Santa Catarina; FMAIII- Rio Grande do Sul e Uruguai, e FMAIV- Argentina (Figura 1.1.2).

O estudo de *P. blainvillei* capturadas no Rio de Janeiro e no Rio Grande do Sul, utilizando marcadores presentes no DNA mitocondrial (análise da região D-loop do DNAmt), demonstrou que a diversidade genética da "forma norte" era menor do que a da "forma sul" e usando análise de haplótipos foram confirmados dois distintos grupamentos correspondentes às regiões geográficas (SECCHI *et al.*,1998). Estudos genéticos recentes apontam para uma estruturação ainda maior da espécie. Já foram definidas molecularmente que a região de separação entre FMAII e III seria dentro do estado de Santa Catarina (OTT *et al.*,2008), talvez uma residente no estuário do Rio da Prata e outra na porção oceânica do Uruguai (COSTA *et al.*,2008b) e ao menos duas no litoral da Argentina (MENDEZ *et al.*,2007).

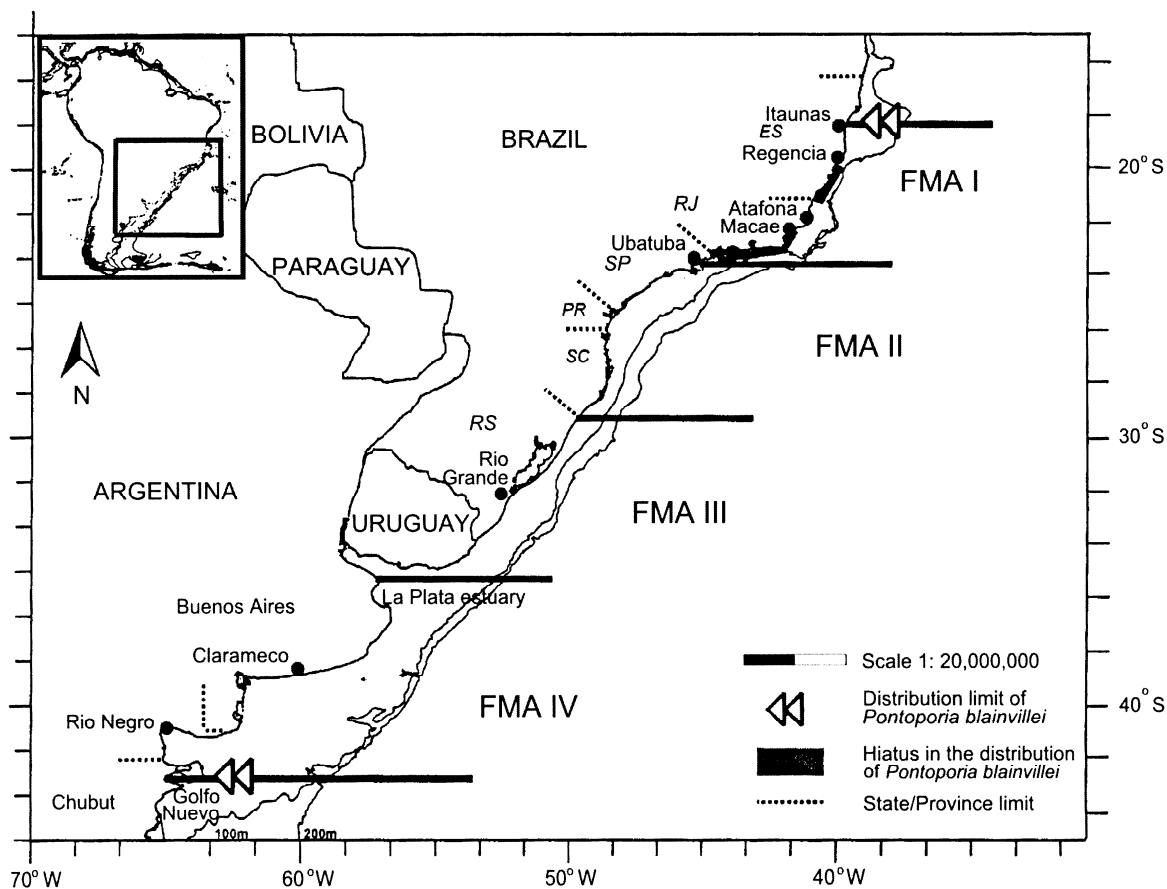


Figura 1.1.2: Mapa das áreas de manejo, Franciscana Management Areas (“FMAs”), baseadas em diferentes níveis de capturas acidentais. Fonte: SECCHI *et al.*, 2002.

A análise da presença de organoclorados (Bifenilos Policlorados-PCB; Diclorodifeniltricloroetanos-DDT; Hexaclorobenzeno-HCB) em *P. blainvillei* de três localidades do litoral de São Paulo (litoral Norte, Baixada Santista e litoral Sul), indicam diferenças dentro da população. Os animais da Baixada Santista apresentaram as maiores concentrações dos compostos analisados, com valores até seis vezes superiores aos dos animais do litoral Norte e Sul, devido a região ser a mais densamente povoada e industrializada. Tais dados sugerem que esses animais possam ter distribuição restrita a certas regiões e podem contribuir para a identificação de estoques dentro da FMA II (São Paulo, Paraná e Santa Catarina) no Estado de São Paulo (ALONSO, 2008).

O Plano de Ação para os Mamíferos Aquáticos do Brasil (IBAMA 1997, 2001) estabelece como prioridades a coleta de material biológico, entre eles, parasitos, dos animais capturados acidentalmente e/ou encontrados mortos em praias. Tais estudos são importantes não só para o

conhecimento das causas de mortalidade natural, mas também como ferramenta para identificação de estoques biológicos, principalmente de espécies pouco conhecidas e com dados insuficientes sobre sua biologia, como ocorre com várias espécies de cetáceos e pinípedes no país.

O termo estoque têm sido usado tanto para entidades biológicas quanto de manejo. Um estoque de manejo é um grupo de indivíduos de uma mesma espécie que é manejado separadamente. O delineamento destes estoques depende dos objetivos do manejo e pode não se basear em informações biológicas por ausência das mesmas. Por outro lado, os estoques biológicos são caracterizados por baixo nível ou nenhuma troca genética, onde os indivíduos tendem a se reproduzir entre si mais do que com outros indivíduos (WANG, 2002). Estes estoques são um artifício humano usados para fins de manejo e conservação, e como tal devem sempre ser interpretados com precaução (ANDRADE, 1996).

1.2. O parasito: Brachycladiidae (Digenea) Odhner, 1905.

Os Brachycladiidae (veja GIBSON, 2005), antigamente conhecidos como campulídeos, parasitam os ductos hepáticos e pancreáticos, intestino, pulmões e seios nasais de mamíferos marinhos. Como indicado por Gibson (2005), bons espécimes são difíceis de serem obtidos de hospedeiros congelados ou em decomposição, resultando em espécimes mal preservados que dificultam a interpretação morfológica.

A sistemática da família é confusa (GIBSON, 2005). Devido ao pouco conhecimento a respeito da biologia e ciclos de vida desta família, a taxonomia é baseada exclusivamente na morfologia de parasitos adultos, utilizando medidas absolutas, proporções corpóreas ou forma. Cerca de vinte e três caracteres são empregados na diferenciação de espécies; os principais são o tamanho do corpo, a extensão dos vitelinos, o tamanho dos ovos e ventosas (FERNÁNDEZ *et al.*, 1995).

A família Campulidae Odhner, 1926 foi estabelecida para os gêneros anteriormente contidos em Brachycladiinae, com base em *Brachycladium* Looss, 1899, que foi estabelecido como sinônimo de *Campula* Cobbold, 1858. Faust (1929) elevou os Brachycladiinae ao status de família como Brachycladiidae. No entanto, Stunkard e Alvey (1930) preferiram usar Campulinae ao invés de Brachycladiinae dentro de Fasciolidae, e incluíram *Campula* (syn. *Brachycladium*), *Lecithodesmus* Braun, 1902, *Orthosplanchnus* Odhner, 1905, *Zalophotrema* Stunkard e Alvey, 1930 e *Synthesium* Stunkard e Alvey, 1930, este último como novo gênero

baseado *Orthosplanchnus tursionis* (Marchi, 1873) Odhner, 1926. Price (1932) aceitou este arranjo adicionando *Odhneriella* Skrjabin, 1905 e *Hadwenius* Price, 1932. *Hadwenius seymouri* Price, 1932 foi considerado como a espécie tipo do gênero proveniente do hospedeiro tipo *Delphinapterus leucas* (Pallas, 1776) do Canadá. *Synthesium* (= *Orthosplanchnus*) *tursionis* (Marchi, 1873) Stunkard e Alvey, 1930, do hospedeiro tipo *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) de águas da Europa era a espécie mais próxima de *H. seymouri*.

Fernández et al. (1994) reclassificou *Synthesium tursionis* (Marchi, 1873) Stunkard e Alvey, 1930) como *Hadwenius tursionis*. No entanto, Gibson (2005) usou *Synthesium* (syn. *Hadwenius*) com base no critério de prioridade (International Code of Zoological Nomenclature-ICZN, 1999, Artigo 23), com *Distomum tursionis* como espécie tipo. Gibson (2002, 2005) discutiu o nome da família com base no Princípio de Coordenação (ICZN, Artigo 36), já que *Brachycladium* tinha prioridade sobre *Campula*, ele colocou Brachycladiidae Odhner, 1905 (syns. Campulidae, Nasitrematidae) em Lepocreadioidea Odhner, 1905.

Atualmente, a taxonomia dos Brachycladiidae segue Gibson (2005) com duas subfamílias: Brachycladiinae (incluindo *Synthesium* Stunkard e Alvey, 1930, *Hunterotrema* McIntosh, 1960, *Campula* Cobbold, 1858, *Oschmarinella* Skrjabin, 1947, *Orthosplanchnus* Odhner, 1905, *Odhneriella* Skrjabin, 1915, *Zalophotrema* Stunkard e Alvey, 1929, e *Brachycladium*, Looss, 1899) e Nasitrematinae (*Nasitrema* Ozaki, 1935 e *Cetitrema* Skrjabin, 1970).

Tais gêneros podem ser encontrados nos mamíferos marinhos em diferentes sítios de infecção, por exemplo, *Zalophotrema* nos ductos biliares de pinípedes, *Campula* no fígado, ductos biliares e pancreáticos de odontocetos, *Nasitrema* nos seios nasais e *Synthesium* no intestino de cetáceos (GIBSON, 2005).

Tursiops truncatus Montagu, 1821 é o hospedeiro tipo para *S. tursionis* (Marchi, 1873) n. comb. (Artigo 1), a espécie mais cosmopolita que parasita o maior número de espécies de odontocetos (FERNÁNDEZ *et al.*, 1998a) e apresenta variabilidade morfológica intra-específica dentro de um mesmo hospedeiro numa área geográfica restrita (FERNÁNDEZ *et al.*, 1994).

A espécie *Synthesium pontoporae* (Raga, Aznar, Balbuena e Dailey, 1994) n. comb. (Artigo 1) exclusiva de *P. blainvillei*, foi considerada por Raga et al. (1994) e Andrade *et al.*, (1997) como um possível bom marcador biológico para diferenciar estoques de “toninhas” por estar presente ao longo da distribuição geográfica da espécie hospedeira. No entanto, a taxonomia da espécie ainda é confusa e necessita ser revisada e comparada com espécies de *Synthesium*, avaliando a possibilidade de novas combinações taxonômicas e posição filogenética dentro da

família Brachycladiidae

Os estudos tradicionais em taxonomia são baseados principalmente na forma, disposição e morfometria de uma grande variedade de caracteres estáveis que possibilitam dar nome a uma espécie (GIBSON, 2002). Apesar da disponibilidade da aplicação de bioquímica e genética, a taxonomia de muitos grupos de parasitos necessita se basear em caracteres morfológicos seguindo as regras do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (International Code of Zoological Nomenclature-ICZN, 1999). As análises morfológica e molecular desta forma devem ser complementares. Estudos intra-específicos morfológicos ou moleculares ainda não foram realizados com espécies de *Synthesium* que ocorrem na nossa costa.

1.3. O parasito como marcador biológico.

O uso dos parasitos como marcadores biológicos começou com estudos realizados em peixes por Dogiel e Bychowsky (1939) e desde então tem sido amplamente utilizados seguindo os critérios estabelecidos por Mackenzie (1987) para diferenciar estoques pesqueiros, evidenciar áreas de recrutamento, migrações sazonais e identificar o papel do hospedeiro na teia trófica (BRAICOVICH e TIMI, 2008; MACKENZIE *et al.*, 2008; TIMI, 2007).

Nos últimos quarenta anos, o estudo das parasitoses tem sido uma importante ferramenta de pesquisa, usando os parasitos de mamíferos marinhos como marcadores biológicos em investigações sobre a filogenia, distribuição, hábitos alimentares e estoques ecológicos (ANDRADE *et al.*, 1997; BALBUENA *et al.*, 1995; DAILIEY, 1979; DAILEY e VOGELBEIN, 1991; MACKENZIE, 1987; MOSER, 1991; WALKER, 2001; SZIDAT, 1964).

O princípio básico do uso de parasitos como marcadores é a comparação intraespecífica do perfil de infecção das infracomunidades de hospedeiros que podem utilizar diferentes nichos ecológicos ao longo de uma ou mais áreas geográficas. Não somente a ausência ou presença dos helmintos deve ser considerada, mas também é importante analisar os índices de infecção, representados principalmente pelas análises da prevalência, abundância e intensidade média (BALBUENA *et al.*, 1995; MACKENZIE, 1987).

Considerando que os trabalhos de identificação morfológica de parasitos envolvem protocolos clássicos de investigação científica adequadamente padronizados e de custo relativamente reduzido, o emprego destes métodos apresentam um custo-benefício satisfatório, fato que favorece a sua utilização em nosso meio (MARIGO, 2003). Recentemente, este tipo de estudo tem avançado se beneficiando de técnicas de biologia molecular, de custo mais elevado,

para identificação taxonômica de parasitos. Tais custos se justificam visto que em vários grupos de parasitos a identificação taxonômica de espécies relacionadas utilizando unicamente dados morfológicos é problemática, considerando que existe um grande período entre a diferenciação genética primária e a diferenciação morfológica (JOUSSON *et al.*,2000).

A helmintofauna de *P. blainvillei* varia ao longo da costa sul e sudeste do Atlântico Ocidental, sendo que as toninhas do sul apresentam uma maior diversidade de parasitos (ANDRADE, 1996; DANILEWICZ *et al.*,2002; MARIGO *et al.*,2002) (Tabela 1.3).

Aznar *et al.* (1995) compararam a helmintofauna das amostras de *P. blainvillei* do Uruguai e da Argentina sugerindo segregação de estoques de acordo com diferenças na dominância e abundância de parasitos. Andrade *et al.*,(1997) propuseram a utilização do *S. pontoporiae* n. comb. (Artigo 1) como marcador biológico para a identificação de estoques de seu hospedeiro. Estes estudos mostraram que os perfis de infecção parasitária das toninhas do Rio Grande do Sul e Uruguai foram similares, mas consideravelmente diferentes das amostras da Argentina, sugerindo a existência de dois estoques ecologicamente distintos (SECCHI *et al.*, 2002).

Tabela 1.3: Comparação das espécies de helmintos gastrointestinais encontradas em espécimes de *Pontoporia blainvillei* provenientes dos estados de São Paulo (Áreas 1, 2 - SP), Paraná (Área 3 - PR) e Rio Grande do Sul (RS), Brasil, e do Uruguay e Argentina*.

Helmintos	Sítio de infecção	Brasil				Uruguai	Argentina	Ref.
		Área 1 SP	Area 2 SP	Area 3 PR	RS			
<i>Anisakis typica</i>	E	-	-	-	x	x	-	1,2,3
<i>Anisakis simplex</i>	E	-	-	-	-	-	x	4
<i>Contracaecum sp</i>	E	-	-	-	-	x	x	4,5,6
<i>Procamallanus sp</i>	E	-	-	-	-	x	-	1,3
<i>Synthesium pontoporiae</i>	E, I	x	x	x	x		x	2,4,7
<i>Polymorphus (P.) cetaceum</i>	E	-	-	-	x	x	x	1,2,3,4
<i>Corynosoma australe</i>	E, I	-	-	-	x	-	-	2
<i>Bolbosoma turbinella</i>	E	-	-	-	x	-	-	2
<i>Pholeter gastrophilus</i>	E	-	-	-	-	-	x	4

*Adaptado de Marigo *et al.* (2002) (x)= presença, (-)= ausência, (E)= estômago, (I)= intestinos, (SP)= São Paulo e (PR)= Paraná. Referências: 1) Kagei *et al.* (1976) (n=1); 2) Andrade (1996) (n=53); 3) Praderi (1984) (n=157); 4) Aznar *et al.* (1994) (n=46); 5) Dailey e Brownell (1972) (n=?); 6) Brownell (1975) (n=191); 7) Marigo *et al.*(2002) (n=41).

No litoral dos estados do Paraná e São Paulo, a única espécie de parasito intestinal encontrado foi o trematódeo *S. pontoporiae* (MARIGO, 2003; MARIGO *et al.*,2002) e no Rio de Janeiro, as *P. blainvillei* examinadas não estavam parasitadas (SANTOS *et al.*,1996), confirmando uma diferença nos índices parasitários nas toninhas com distribuição mais ao sul da costa brasileira (ANDRADE, 1996; DANILEWICZ *et al.*,2002; MARIGO *et al.*,2002). Além disso, a comparação da prevalência e intensidade média de *S. pontoporiae* de duas áreas de São Paulo, do litoral do Paraná e do Rio Grande do Sul também mostrou diferenças significativas, sugerindo que as toninhas do Paraná e São Paulo pertençam a um mesmo estoque, diferente dos animais do Rio Grande do Sul (MARIGO *et al.*,2002). Tais informações corroboram com outros dados biológicos que definem as formas norte e sul de *P. blainvillei* (SECCHI *et al.*,2003a).

1.4 Ciclo evolutivo de trematódeos marinhos.

Poucos ciclos de parasitos de mamíferos marinhos já foram elucidados, e este conhecimento é especialmente escasso no Brasil. A maioria dos ciclos são indiretos, heteroxenos, onde a infecção ocorre mais comumente através da dieta; tendo em sua maioria, os moluscos e peixes como hospedeiros intermediários (Figura 1.4.1).

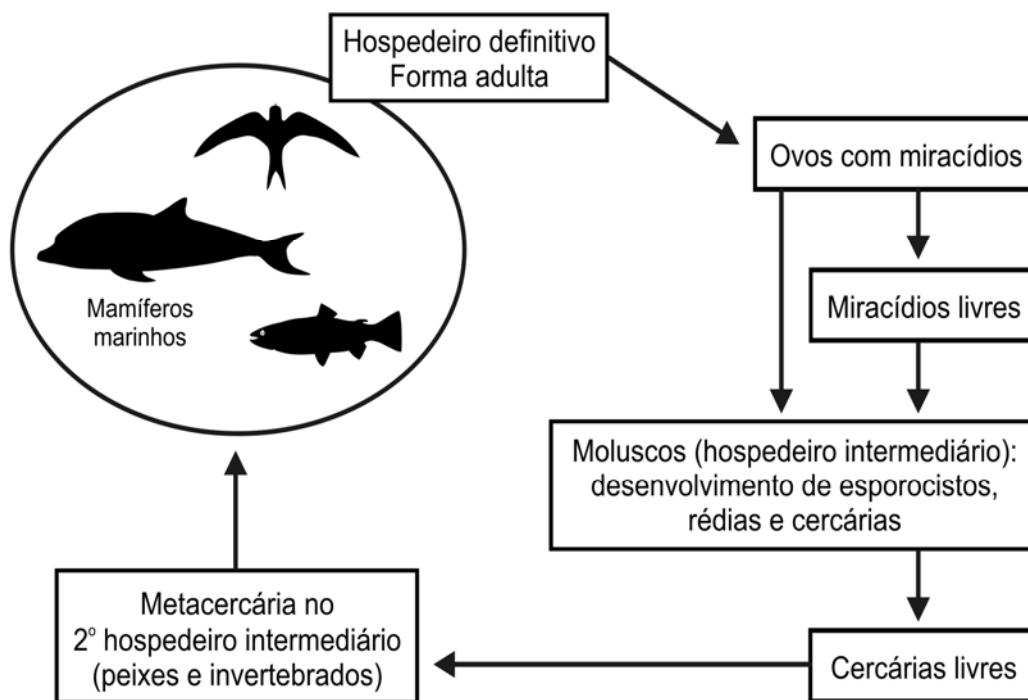


Figura 1.4.1: Esquema do ciclo de vida geral de trematódeos no ambiente marinho.

A variedade da fauna parasitária, sua intensidade e a incidência de infestação são determinadas principalmente pelos seguintes fatores: a) dieta do hospedeiro, b) tempo de vida do hospedeiro, c) mobilidade do hospedeiro, incluindo a variedade de habitats que encontra durante a vida, d) densidade populacional (espécies gregárias ou não), e e) tamanho atingido (grandes hospedeiros proporcionam mais habitats adequados para parasitas do que pequenos) (HOLMES, 1990 apud MARIGO, 2003).

O ciclo evolutivo de *S. pontoporiae* ainda não é conhecido, porém, os trematódeos em geral utilizam um molusco como primeiro hospedeiro intermediário havendo a possibilidade de outros organismos participarem do ciclo evolutivo. Baseado na dieta alimentar da toninha que inclui além de lulas, camarões e peixes, qualquer um destes animais pode fazer parte do ciclo.

1.5. Estudo da Relação Parasito-Hospedeiro.

Parasitismo é uma das relações ecológicas mais comuns entre os eucariotos. Ainda assim, os estudos de ecologia molecular de parasitos movem-se lentamente. Marcadores moleculares são fundamentais para o estudo de processos como a transmissão, a evolução da especificidade parasito-hospedeiro e padrões de especiação. Estudos moleculares também têm aplicações bastante práticas como no estudo da evolução e controle de resistência a drogas. Outra razão para o estudo dos parasitos é que os mesmos exibem uma grande diversidade de ciclos de vida e estilos de vida (modos de reprodução e habilidades de dispersão, por exemplo). Isso proporciona uma grande oportunidade de estudos comparativos para testar questões parasito-específicas ou questões sobre evolução em geral (CRISCIONE *et al.*, 2005).

A estrutura genética dos parasitos pode potencialmente ser usada para inferir informações sobre a estrutura genética de seus hospedeiros. Se um parasito apresenta maior variabilidade genética e estruturação populacional que seu hospedeiro, pode-se potencialmente utilizar os genótipos de uma única espécie de parasito para designar as populações de origem dos hospedeiros com maior probabilidade do que usando os genótipos do próprio hospedeiro (CRISCIONE *et al.*, 2005).

Price (1980) sugeriu que populações de parasitos são caracterizadas por altas taxas de endocruzamento, baixa variabilidade genética intrapopulacional e alta taxa de diferenciação entre populações devido à deriva gênica, efeito fundador e dinâmicas desiguais. Este era o suposto cenário desde então, no entanto, a informação genética que está sendo construída (devagar) mostra que pode ser incorreto. Por exemplo, a maioria dos Nematoda estudados mostram poucas

evidências de fluxo gênico reduzido. Os estudos de marcadores genéticos populacionais de digenéticos ainda são raros e há pouca informação disponível (JARNE e THERON, 2001).

1.6. Genoma de Digenea.

DNA ribossomal

Dados de sequências de DNA ribossomal têm fornecido a base para inferências filogenéticas de eucariotos e procariotos. O primeiro estudo a tratar as relações genéticas dos Digenea foi baseado no gene 18S RNAr completo (OLSON e TRACK, 2005). O gene 18S RNAr tem aproximadamente 1800 nucleotídeos e variações no tamanho têm sido observadas em protistas, platelmintos e artrópodes. O aumento é devido a grandes inserções em regiões variáveis do gene, sendo as regiões V4 e V7 as mais afetadas. As estruturas secundárias destas duas regiões variáveis têm sido usadas para fornecer informação relacionada à evolução do gene 18S RNAr (HWANG *et al.*,2000; REDMOND e MCCORMACK, 2008; VOIGT *et al.*,2008).

Para trematódeos, geralmente, a variabilidade da região intergênica do DNA ribossomal (ITS RNAr) distingue claramente espécies. Espécies muito próximas podem ter poucas bases de diferença e, em pelo menos um caso convincente, as sequências de ITS2 de duas espécies são idênticas (NOLAN e CRIBB, 2005). Em alguns casos, a região do ITS1 dá mais resolução que a ITS2 devido à presença de unidades de repetições variáveis não presentes no ITS2. A variação intra-específica é pequena, mas reportada em vários estudos sendo a informação sobre variação geográfica escassa (NOLAN e CRIBB, 2005).

Entre os trematódeos, não existe um precedente estabelecido com relação a qual marcador molecular deve ser usado para estudos populacionais ou outros propósitos (ZAROWIECKI *et al.*,2007). Pouco se conhece sobre as taxas de divergência relativa de DNA nuclear versus DNA mitocondrial em trematódeos, no entanto, estudos demonstram que as sequências mitocondriais de platelmintos acumulam substituições nucleotídicas numa taxa muito mais alta que o ITS (VILAS *et al.*,2005).

DNA mitocondrial

O genoma mitocondrial dos trematódeos inclui dois genes ribossomais, 12 codificantes de proteínas e 22 RNA transportadores (RNAt). A busca por uma região universal para ser usada como “código de barras” contribuiu para que se baseassem primariamente (ou até exclusivamente) em sequências parciais da citocromo c oxidase I (coxI ou COI), mesmo este

marcador não sendo o mais informativo ou adequado para todos os taxa (ZAROWIECKI *et al.*,2007).

Dentre os Brachycladiidae parasitos de mamíferos marinhos, somente sequências dos genes 18S RNAr e nicotinamida dinucleotídeo desidrogenase subunidade 3 (ND3) estão disponíveis e foram usados em estudos filogenéticos. No estudo do gene ND3 DNAm de cinco gêneros, *S. tursionis* foi utilizado como única espécie do gênero *Synthesium* (FERNÁNDEZ *et al.*,1998a-b).

No presente projeto, levando-se em conta que temos uma coleção de espécimes de *S. pontoporiae* coletados em pontos representativos da costa sul e sudeste brasileira é proposto um estudo morfo-genético deste parasito. A recuperação de sequências de genes nucleares e mitocondriais permitirá análises tanto do ponto de vista taxonômico quanto populacionais. Sob o ponto de vista de ações de manejo, as possíveis variações intra-específicas podem ser utilizadas como ferramenta na definição de estoques e auxiliar em ações que visem a conservação de seu hospedeiro, *P. blainvillei*, altamente ameaçado. A partir da informação genética obtida sobre *S. pontoporiae*, também poderá ser viabilizado o diagnóstico molecular da espécie, em possíveis hospedeiros intermediários, sendo uma contribuição inédita para o conhecimento do ciclo evolutivo do parasito e a informação a cerca da distribuição geográfica dos diferentes hospedeiros ao longo da costa brasileira.

A tese está estruturada no formato de introdução, objetivos, resultados: três artigos, discussão e conclusões.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o papel de *Synthesium pontoporiae* como possível marcador biológico para diferenciar os estoques de *Pontoporia blainvillei*.

2.2. Objetivos específicos

- Redescrever *Synthesium pontoporiae* e acessar sua posição sistemática.
- Comparar morfológicamente *S. pontoporiae*, *S. tursionis* e *S. seymouri*.
- Caracterizar geneticamente *S. pontoporiae*.
- Avaliar as variações morfo-genéticas de *S. pontoporiae* nas diferentes áreas de coleta.

3. Resultados

3.1. Artigo 1

J. Parasitol., 94(2), 2008, pp. 505–514
© American Society of Parasitologists 2008

REDESCRIPTION OF *SYNTHESIUM PONTOPORIAE* N. COMB. WITH NOTES ON *S. TURSIONIS* AND *S. SEYMOURI* N. COMB. (DIGenea: BRACHYCLADIIDAE ODHNER, 1905)

Juliana Marigo*†, Ana Carolina Paulo Vicente*, Ana Luisa Schifino Valente‡, Lena Measures§, and Cláudia Portes Santos||#

ABSTRACT: *Synthesium pontoporiae* n. comb. is redescribed, together with *Synthesium tursionis* and *Synthesium seymouri* n. comb.; the parasites were obtained from stranded and accidentally caught cetaceans. The sucker ratio (ratio between widths of the oral and ventral suckers) in *S. pontoporiae* was 1:1.8–3.0 (mean 1:2.2); in *S. tursionis* was 1:0.8–1.2; and in *S. seymouri* was 1:0.5–0.7. *Synthesium pontoporiae* differed from its congeners by additional diagnostic characters, including: oval to lobed testes; small cirrus with pyriform proximal region and flexible, tubular distal region formed by evagination of ejaculatory duct; and vitellarium in small follicles extending from the level of the seminal vesicle to the posterior extremity of the body and not forming dendritic radial bunches. Data on the morphology of adult *S. pontoporiae* and *S. tursionis* were inferred from confocal laser microscopical observations.

The brachycladiids (see Gibson, 2005), formerly known as campulids, parasitize the hepatic and pancreatic ducts, intestine, lungs, and head sinuses of marine mammals. As indicated by Gibson (2005), good specimens are difficult to obtain from decomposed or frozen hosts, resulting in poorly preserved specimens that make interpretation of the morphology difficult. Their taxonomy is problematic and has a convoluted history (Fernández et al., 1994; Gibson, 2005).

The Campulidae Odhner, 1926 was established for genera previously contained in the Brachycladiinae, based on *Brachycladium* Loss, 1899, which was believed to be a synonym of *Campula* Cobbold, 1858. Faust (1929) raised the Brachycladiinae to a family status as the Brachycladiidae. However, Stunkard and Alvey (1930) preferred to use Campulinae rather than Brachycladiinae within the Fasciolidae, and included *Campula* (syn. *Brachycladium*), *Lecithodesmus* Braun, 1902, *Orthosplanchnus* Odhner, 1905, *Zalophotrema* Stunkard and Alvey, 1930, and *Synthesium* Stunkard and Alvey, 1930, the latter as a new genus based on *Orthosplanchnus tursionis* (Marchi, 1873) Odhner, 1926. Price (1932) accepted this latter arrangement, adding *Odhneriella* Skrjabin, 1905 and *Hadwenius* Price, 1932; *Hadwenius seymouri* Price, 1932 was considered as the type species of the latter genus, from the type host *Delphinapterus leucas* (Pallas, 1776) from Canada. *Hadwenius seymouri* was described as having an oral sucker slightly larger than the ventral sucker, oval testes, and a vitellarium composed of rosette masses of radiating cords of follicles extending from the vicinity of the anterior testis to the posterior extremity of the body. *Synthesium* (= *Orthosplanchnus*) *tursionis* (Marchi, 1873) Stun-

kard and Alvey, 1930, from the type host *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) in European waters, was the most closely related species to *H. seymouri*.

Fernández et al. (1994) considered re-classifying *Synthesium tursionis* as *Hadwenius tursionis*. However, Gibson (2005) used *Synthesium* (syn. *Hadwenius*) based on the criterion of priority (International Code of Zoological Nomenclature—ICZN, 1999, Article 23), with *Distomum tursionis* as the type species. Gibson (2002, 2005) discussed the family group name based on the Principle of Coordination (ICZN, 1999, Article 36); since *Brachycladium* had priority over *Campula*, he placed Brachycladiidae Odhner, 1905 (syns. Campulidae, Nasitrematidae) in the Lepocreadioidea Odhner, 1905. At present, the taxonomy of the Brachycladiidae follows Gibson (2005) with 2 subfamilies, i.e., Brachycladiinae (including *Synthesium*, *Hunterotrema* McIntosh, 1960, *Campula*, *Oschmarinella* Skrjabin, 1947, *Orthosplanchnus*, *Odhneriella* Skrjabin, 1915, *Zalophotrema*, and *Brachycladium*) and Nasitrematinae (including *Nasitrema* Ozaki, 1935 and *Cetitrema* Skrjabin, 1970).

Pontoporia blainvillei Gervais and d'Orbigny, 1844 is a small cetacean, commonly called franciscana and endemic to South Atlantic waters, that occurs from Espírito Santo State, Brazil (18°25'S) to Peninsula Valdez, Argentina (42°35'S) (Siciliano et al., 2002). The species is in danger of extinction, and it is a priority of the Brazilian environmental agency (IBAMA 1997, 2001) to identify and characterize possible stocks or subpopulations.

The intestinal trematode *Synthesium pontoporiae* (Raga et al., 1994) n. comb. is exclusive to *P. blainvillei* and was proposed as a biological indicator for stock identification of the franciscana (Aznar et al., 1995; Andrade et al., 1997; Secchi et al., 2002). To investigate the value of this trematode as a biological indicator, samples were collected since 1997 from franciscanas in different areas off the Brazilian coast, enabling an analysis of *S. pontoporiae* along the southeastern and southern Brazilian coastlines.

However, during our initial work, we realized that the description of *Synthesium* was incomplete and that *S. pontoporiae* was not well differentiated from related species of the genus, as indicated by the original description; i.e., as *Hadwenius pontoporiae*. Furthermore, Raga et al. (1994) did not differentiate *S. pontoporiae* from *S. tursionis*, the most closely related species, since they were, at that time, in separate genera. In the present paper, we redescribe *S. pontoporiae* based on the para-

Received 24 April 2007; revised 4 June 2007, 10 August 2007; accepted 15 August 2007.

* Laboratório de Genética Molecular e Microorganismos, Departamento de Genética, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, 21045-900, Brazil. e-mail: cpsantos@ioc.fiocruz.br

† Projeto BioPesca, Rua Paraguai 241, Praia Grande, São Paulo, 11702-070, Brazil.

‡ Departamento de Morfologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/nº, Pelotas, Rio Grande do Sul, Caixa Postal 354, 96010-900, Brazil.

§ Fisheries and Oceans Canada, Maurice Lamontagne Institute, 850 Route de la mer, Mont-Joli, Qc, Canada, G5H 3Z4.

|| Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Departamento de Biologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, 21045-900, Brazil.

To whom correspondence should be addressed.

type and new specimens. *Synthesium tursionis* from *Tursiops truncatus* in Brazilian waters and *Synthesium seymouri* n. comb. from *Delphinapterus leucas* in Canadian northwest Atlantic waters were also studied.

MATERIALS AND METHODS

All cetaceans studied, whether accidentally caught or stranded, were in different stages of decomposition. Their collection and transport for research was authorized by the Brazilian environmental agency (IBAMA). Specimens of *P. blainvillei* were collected on the southeastern and southern coast of Brazil in 6 different areas; i.e., São Paulo North, São Paulo Central, São Paulo South, Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul. *Tursiops truncatus* specimens were collected from Santa Catarina. *Delphinapterus leucas* specimens were collected from Saint-André de Kamouraska, St. Lawrence Estuary, Québec, Canada.

During necropsies, intestines were collected and frozen to be examined later in the laboratory. The intestines of *D. leucas* were examined when relatively fresh, i.e., not frozen first. The intestines were measured and opened; their contents were washed into a 150- μ m mesh sieve and examined with a dissecting microscope. Specimens of *S. pontoporiae* and *S. tursionis* were fixed in 70% alcohol and those of *S. seymouri* were fixed in AFA. Parasites were stained in Gomori's trichrome, Delafield hematoxylin, or alcoholic chloridic carmine, cleared in beechwood creosote, and mounted in Canada balsam. Drawings were made with the aid of a microscope tube. Measurements are presented as a range in micrometers, with the mean in parentheses.

The terminology used to describe testes shapes are: oval, wavy (undulating), or lobed. The sucker ratio refers to the ratio between the widths of the oral and ventral suckers.

Confocal laser scanning electron microscopy (CLSM) studies were performed using an LSM510 META Zeiss, Hamburg, Germany; the specimens analyzed were previously stained with alcoholic chloride carmine.

For each geographic region, the sucker ratios of 15–20 specimens of *S. pontoporiae* from different hosts (total 94 flukes) were pooled and the data analyzed for intra-specific variability. Inter-specific differences in the sucker ratios were also verified among *S. pontoporiae*, *S. tursionis*, and *S. seymouri*. Statistical differences within, and between, species were verified by a 1-way ANOVA (STATISTICA for Windows, Stat Soft, Inc., Tulsa, Oklahoma). Post-hoc comparisons of means were performed using a Scheffé test. Results were considered significant at $P < 0.05$.

Specimens used in the present study are deposited in the Helminthological Collection of Oswaldo Cruz Institute (CHIOC): *S. pontoporiae* no. 36.856a–b, 36.857a–b, 36.858a–b, *S. tursionis* no. 36.859a–b, 36.860 and *S. seymouri* no. 36.861a–c. In addition, the paratype of *S. pontoporiae* from the U.S. National Parasite Collection in Beltsville, Maryland (USNPC 82916) was examined.

RESULTS

In total, 95 specimens, identified as *Synthesium pontoporiae*, were collected, from the first part of the small intestine of *Pontoporia blainvillei*, from 6 different areas of the host's distribution (Table I). No significant statistical differences were observed in the sucker ratio of *S. pontoporiae* within, or between, the 6 areas of the host's distribution. Considering the similarity in the morphology of the parasites from these areas, the redescription was based on 20 specimens from the São Paulo Central region and the paratype (USNPC 82916). Our study of *Synthesium tursionis* was based on 15 specimens from *Tursiops truncatus* and the examination of *Synthesium seymouri* was based on 10 specimens from *Delphinapterus leucas*. The sucker ratios of *S. pontoporiae*, *S. tursionis*, and *S. seymouri* were statistically different ($P < 0.001$).

REDESCRIPTIONS

Synthesium pontoporiae (Raga, Aznar, Balbuena, and Dailey, 1994) n. comb. (Figs 1–7, Table II)

Adult: Measurements based on 20 specimens. Body elongate 3,619–7,080 \times 323–693 (4,996 \times 480), with maximum width at level of ovary (Fig. 1). Tegument spinose. Oral sucker subterminal, 124–200 \times 105–171 (164 \times 131). Ventral sucker, pre-equatorial, 225–380 \times 193–371 (310 \times 290). Sucker ratio 1:1.8–3.0 (1:2.2) (Figs. 1, 4). Prepharynx extendable, 69–352 (200); pharynx pyriform, strongly muscular, 114–323 \times 37–171 (164 \times 93) at largest width. Esophagus variable in length. Intestine H-shaped; anterior ceca reach posterior level of oral sucker and posterior ceca end blindly close to posterior extremity. Testes irregular in shape, varying from oval to lobed (Fig. 2, Table II), in middle third of body. Anterior testis 162–523 \times 114–238 (310 \times 164), posterior testis 190–523 \times 97–322 (335 \times 222). Cirrus sac elongate-claviform, 708–1,309 (939) long, extends dorsally to ventral sucker to open via genital atrium (Fig. 3). Seminal vesicle long, coiled, occupies almost entire posterior half of cirrus sac, opens into pars prostatica via sphincter; pars prostatica tubular, continues as ejaculatory duct within cirrus and opens into genital atrium (Figs. 5, 6); small cirrus with pyriform proximal region apparently permanent (Fig. 7) and flexible, tubular distal region, formed by evagination of ejaculatory duct which may reflex or extend through genital pore (Fig. 3); small spines seen on proximal part of cirrus (readily lost in dead or fixed material). Genital pore at anterior margin of ventral sucker, 637–1,417 (971) from anterior end. Ovary round to oval, 87–262 \times 67–171 (174 \times 127), pretesticular. Mehlis' gland pre-ovarian. Vitellarium arranged in small follicles in lateral fields of body, from level of seminal vesicle extending to posterior extremity, not forming dendritic radial bunches. Vitelline reservoir at level of ovary. Uterus coils intercecally, from ovary to genital pore. Metraterm unarmed. Eggs oval, 46–60 \times 23–28 (53 \times 26), slightly flattened at opercular pole. Excretory vesicle long, tubular, reaches level of gonads. Excretory pore subterminal.

Taxonomic summary

Host: *Pontoporia blainvillei*.

Locality: Off São Paulo, Brazil (24°00'S, 46°24'W).

Site: Small intestine.

Synonymy: *Hadwenius pontoporiae* Raga, Aznar, Balbuena and Dailey, 1994

Paratype (USNPC 82916)

(Fig. 8)

Adult: Measurements based on 1 specimen. Body elongate, 5,082 \times 662 at level of ovary. Spines of tegument not observed. Oral sucker subterminal 201 \times 169. Ventral sucker 327 \times 340. Sucker ratio 1:2.01. Prepharynx not observed. Esophagus variable in length. Pharynx pyriform, 239 \times 120 at largest width. Intestine H-shaped; anterior ceca reach level of oral sucker; posterior ceca end blindly near posterior extremity. Testes irregular in shape, lobed, in middle third of body. Anterior testis 285 \times 230; posterior testis 322 \times 207. Cirrus sac elongate-claviform, 1,078 long, opens via genital atrium. Seminal vesicle long, coiled, in posterior half of cirrus sac, opens into pars prostatica; pars prostatica tubular, continues as ejaculatory duct within cirrus and opens into genital atrium. Cirrus small, proximal region pyriform, distal region tubular, formed by evagination of ejaculatory duct which extends through genital pore; spines not visible. Genital pore at 755 from anterior end, at anterior margin of ventral sucker. Ovary almost round, 147 \times 156, pretesticular. Mehlis' gland and vitelline reservoir pre-ovarian. Vitelline follicles in lateral fields of body, from level of seminal vesicle to posterior extremity. Uterus intercecal, between ovary and genital pore. Metraterm unarmed. Eggs oval, 51–55 \times 28–28 (54 \times 28). Excretory vesicle tubular; excretory pore terminal.

Taxonomic summary

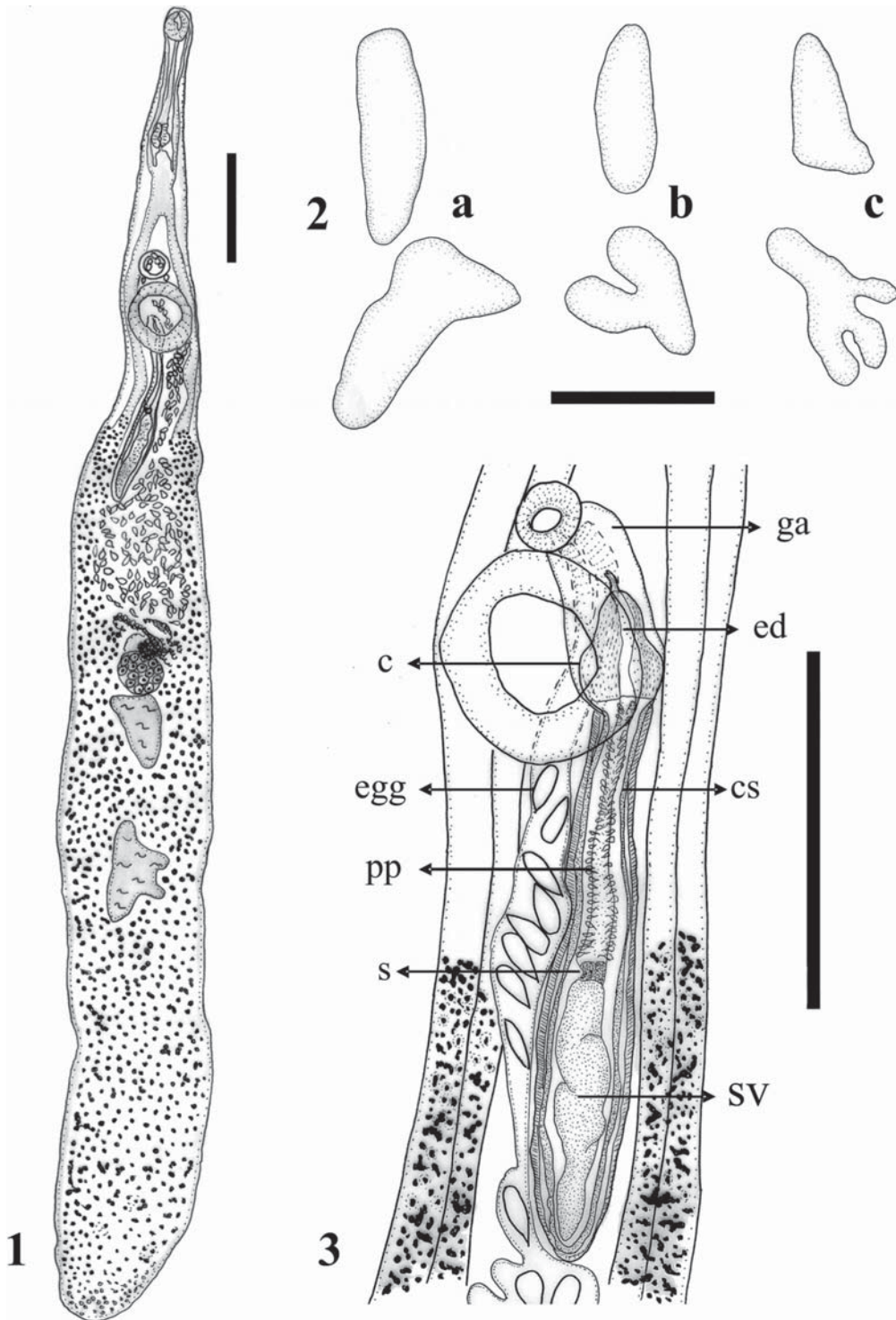
Type host: *Pontoporia blainvillei*.

Type locality: Off Necochea, Argentina (38°37'S, 58°50'W).

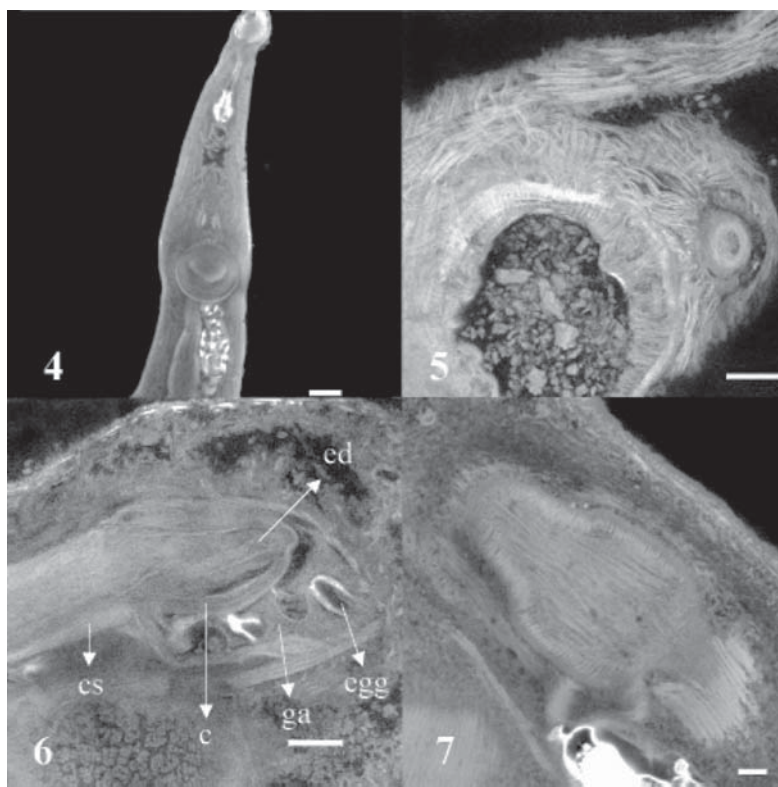
Site: Small intestine.

TABLE I. Measurements of *Synthesium pontoporiae* n. comb. from *Pontoporia blainvilliei* from different geographical areas of Brazil. np = number of parasites, nh = number of hosts.

Geographical Area	São Paulo North (np = 15, nh = 6)	São Paulo Central (np = 20, nh = 11)	São Paulo South (np = 15, nh = 6)	Paraná (np = 15, nh = 4)	Santa Catarina (np = 15, nh = 4)	Rio Grande do Sul (np = 15, nh = 3)
Body	3,219–6,838 × 431–693 (5,180 × 608)	3,619–7,080 × 323–693 (4,996 × 480)	3,896–7,394 × 400–847 (4,777 × 658)	2,618–6,037 × 262–678 (4,178 × 426)	3,896–4,943 × 308–847 (4,419 × 503)	4,096–6,899 × 354–801 (5,442 × 638)
Oral sucker	114–205 × 95–171 (170 × 135)	124–200 × 105–171 (164 × 131)	138–219 × 114–190 (178 × 144)	97–184 × 83–147 (141 × 115)	101–170 × 92–162 (146 × 124)	124–190 × 115–152 (162 × 135)
Ventral sucker	257–399 × 275–399 (343 × 312)	225–380 × 193–371 (310 × 290)	276–447 × 257–409 (350 × 349)	138–336 × 138–304 (236 × 233)	193–380 × 170–390 (270 × 271)	244–570 × 276–428 (360 × 341)
Ratio oral/ventral sucker	1:1,88–2,80 (1:2,34)	1:1,82–2,99 (1:2,21)	1:2–2,92 (1:2,43)	1:1,51–2,49 (1:1,99)	1:1,6–2,83 (1:2,16)	1:1,99–2,92 (1:2,52)
Prepharynx	57–551 (192)	69–352 (200)	55–456 (168)	120–409 (220)	92–216 (139)	124–304 (200)
Pharynx	114–200 × 92–124 (154 × 102)	114–323 × 37–171 (164 × 93)	133–209 × 76–114 (171 × 99)	55–193 × 51–115 (126 × 74)	92–179 × 78–120 (140 × 91)	120–189 × 86–179 (163 × 111)
Genital pore/anterior end	616–1,817 (1,002)	637–1,417 (971)	662–1,355 (940)	532–1,540 (916)	616–931 (792)	108–1,463 (988)
Ovary	114–257 × 114–247 (203 × 160)	87–262 × 67–171 (174 × 127)	124–266 × 95–258 (179 × 170)	74–216 × 74–230 (123 × 112)	110–200 × 101–166 (156 × 133)	105–475 × 105–262 (195 × 169)
Anterior testis	276–608 × 138–342 (418 × 202)	162–523 × 114–238 (310 × 164)	207–513 × 133–409 (340 × 211)	166–322 × 60–253 (252 × 143)	179–380 × 106–238 (283 × 167)	228–561 × 110–304 (402 × 199)
Posterior testis	207–608 × 190–462 (416 × 282)	190–523 × 97–322 (335 × 222)	230–570 × 114–380 (381 × 248)	74–331 × 106–331 (252 × 201)	207–475 × 110–323 (328 × 210)	238–627 × 170–409 (406 × 253)
Cirrus-sac	665–1,170 (964)	708–1,309 (939)	493–1,309 (820)	504–1,032 (776)	722–1,047 (835)	693–1,540 (930)
Eggs	46–60 × 23–32 (55 × 27)	46–60 × 23–28 (53 × 26)	51–60 × 23–28 (56 × 27)	46–60 × 25–32 (56 × 29)	51–60 × 28–32 (55 × 29)	51–64 × 23–33 (58–29)



FIGURES 1–3. *Synthesium pontoporiae* n. comb. from *Pontoporia blainvillei*. (1) Total body, ventral view. (2) Testes anterior (top row) and posterior (bottom row)—(a) oval/wavy, (b) oval/lobed and (c) wavy and lobed. (3) Cirrus sac (cs), cirrus (c), ejaculatory duct (ed), genital atrium (ga), pp (pars prostatica), sphincter (s), seminal vesicle (sv) and eggs in uterus (egg). Scale bars: Figs. 1, 3 = 600 μ m; Fig. 2 = 400 μ m.



FIGURES 4–7. *Synthesium pontoporiae* n. comb. from *Pontoporia blainvillei*, confocal microscopy. (4) Anterior region showing oral and ventral suckers and pharynx. (5) Detail of genital pore and ventral sucker. (6) Cirrus sac (cs), cirrus (c), ejaculatory duct (ed), genital atrium (ga) and eggs in uterus (egg). (7) Detail of pyriform cirrus. Scale bars: Fig. 4 = 100 μ m; Figs. 5, 6 = 50 μ m; Fig. 7 = 10 μ m.

***Synthesium tursionis* (Marchi, 1873) Stunkard and Alvey, 1930**
(Figs. 9–11)

Adult: Measurements based on 15 specimens. Body elongate, 8,855–21,313 \times 477–847 (14,357 \times 618), with maximum width at level of ovary (Fig. 9). Tegument spinose. Oral sucker subterminal, 431–722 \times 462–675 (600 \times 554). Ventral sucker pre-equatorial, 400–760 \times 428–684 (560 \times 552). Sucker ratio 1:0.8–1.21 (1:1.01). Prepharynx extensible, 200–789 (527); pharynx pyriform, strongly muscular, 409–678 \times 185–333 (526 \times 258). Esophagus variable in length. Intestine H-shaped; anterior ceca reach posterior level of oral sucker and posterior ceca reach posterior extremity. Testes irregular in shape, varying from oval

to lobed, in middle third of body. Anterior testis 409–1,093 \times 276–618 (661 \times 345); posterior testis 475–1,112 \times 266–589 (686 \times 369). Cirrus sac elongate-claviform, 1,432–2,911 (2,193) long, extends dorsally to ventral sucker to open into genital atrium. Genital pore at 2,079–3,970 (2,940) from anterior end, close to anterior margin of ventral sucker. Seminal vesicle long, occupies posterior third of cirrus sac; pars prostatica long, occupies middle third of cirrus sac. Cirrus tubular, eversible with small, readily lost spines (Figs. 10, 11). Ovary round to oval, 143–339 \times 124–247 (238 \times 169), pretesticular. Vitelline reservoir and Mehli's gland pre-ovarian. Vitellarium arranged in small follicles in lateral fields of body from posterior to cirrus sac to posterior extremity, not

TABLE II. Variation in the testes of *Synthesium pontoporiae* n. comb.; shape and percentage in different geographical areas off the coast of Brazil. np = number of parasites.

Area	Position	Oval	Wavy	Lobed
SP North np = 15	Anterior	53.3% (8/15)	40.0% (6/15)	6.7% (1/15)
	Posterior	6.7% (1/15)	33.3% (5/15)	60.0% (9/15)
SP Central np = 20	Anterior	55.0% (11/20)	20.0% (4/20)	25.0% (5/20)
	Posterior	0	40.0% (8/20)	60.0% (12/20)
SP South np = 15	Anterior	26.7% (4/15)	53.3% (8/15)	20.0% (3/15)
	Posterior	6.7% (1/15)	46.7% (7/15)	46.7% (7/15)
Paraná np = 15	Anterior	40.0% (6/15)	20.0% (3/15)	33.3% (5/15)
	Posterior	0	6.7% (1/15)	86.7% (13/15)
Santa Catarina np = 15	Anterior	53.3% (8/15)	40.0% (6/15)	6.7% (1/15)
	Posterior	6.7% (1/15)	33.3% (5/15)	60.0% (9/15)
Rio Grande do Sul np = 15	Anterior	60.0% (9/15)	40.0% (6/15)	0
	Posterior	13.3% (2/15)	13.3% (2/15)	73.3% (11/15)



FIGURE 8. *Synthesium pontoporiae* n. comb., paratype. Total body, ventral view. Scale bar: 600 = μ m.

forming dendritic radial bunches. Uterus coils intercecally, from ovary to genital pore. Metraterm unarmed. Eggs oval, 51–55 \times 28–32 (53 \times 29), slightly flattened at opercular pole. Excretory vesicle long, tubular, reaches level of gonads. Excretory pore dorsal, subterminal.

Taxonomic summary

Host: *Tursiops truncatus*.

Locality: Off Santa Catarina, Brazil (26°37'S, 48°41'W).

Site: Small intestine.

Synonyms: *Distomum tursionis* Marchi, 1873; *D. longissimum* Poirier, 1886 nec *D. longissimum* von Linstow, 1896; *Orthosplanchnus tursionis* (Marchi, 1873) Odhner, 1926; *Synthesium tursionis* (Marchi, 1873) Price, 1932 and *Hadwenius tursionis* (Marchi, 1873) Fernández, Balbuena and Raga, 1994.

***Synthesium seymouri* (Price, 1932) n. comb.**
(Figs. 12–14)

Adult: Measurements based on 10 specimens. Body elongate 27,258–38,115 \times 616–1001 (34,154 \times 793), with maximum width at level of ovary (Fig. 12). Tegument spinose. Oral sucker subterminal, cup-shaped, 1,786–2,618 \times 1,278–2,079 (2,025 \times 1,645). Ventral sucker pre-equatorial, 1,078–1,463 \times 770–1,386 (1,260 \times 1,001). Sucker ratio 1:0.48–0.70 (1:0.60). Prepharynx extensible, 447–1,263 (792). Pharynx oval, strongly muscular, 939–1,232 \times 724–1,309 (1,029 \times 839). Esophagus variable in length. Intestine H-shaped; anterior ceca extends close to posterior level of oral sucker; posterior ceca reach posterior extremity of body. Testes regular in shape, oval, in middle third of body. Anterior testis 1,278–1,848 \times 477–970 (1,569 \times 707); posterior testis 1,263–1,925 \times 508–847 (1,588 \times 676). Cirrus sac elongate-claviform, 2,464–4,158 (3,253) long, extends dorsally to ventral sucker to open into genital atrium (Fig. 13). Genital pore at 3,696–5,929 (4,777) from anterior end, at anterior margin of ventral sucker. Seminal vesicle occupies proximal third, pars prostatica occupies middle third, and tubular cirrus occupies anterior third, of cirrus sac. Cirrus eversible. Spines of cirrus not observed. Ovary oval, pretesticular, 231–431 \times 154–323 (337 \times 231). Mehlis' gland pre-ovarian. Vitelline reservoir close to ovary. Vitellarium arranged in radial dendritic bunches of follicles in lateral fields of body, from level of testes to posterior extremity of body (Fig. 14). Uterus coils intercecally, from level of ovary to genital pore. Metraterm unarmed. Eggs oval, 83–97 \times 51–55 (91 \times 55), slightly flattened at opercular pole. Excretory vesicle long, tubular. Excretory pore dorsal, subterminal.

Taxonomic summary

Host: *Delphinapterus leucas*.

Locality: Near Saint-André de Kamouraska, St. Lawrence Estuary, Québec, Canada (47°40'N, 69°43'W).

Site: Intestine.

Synonym: *Hadwenius seymouri* Price, 1932

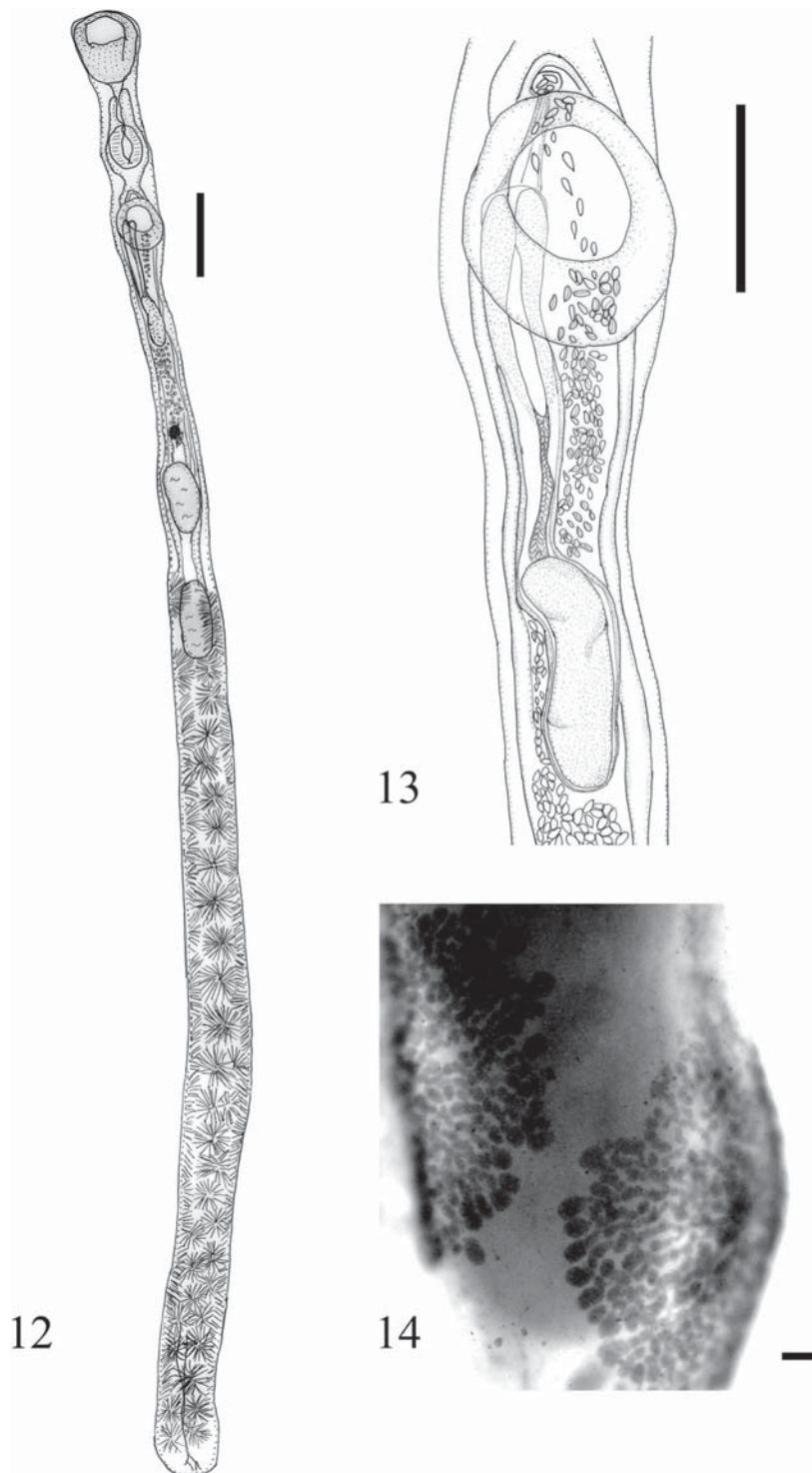
DISCUSSION

The redescription of *S. pontoporiae*, based on a paratype from *P. blainvillei* taken off Argentina, 20 specimens from *P. blainvillei* from the São Paulo Central region, and an additional 75 measurements from *P. blainvillei* from 6 areas off Brazil, indicated a wide range in body and prepharynx length (Table I). This variation, and the observed loss of tegumental and cirrus spines, is almost certainly due to the hosts being dead and frozen, an observation already reported by other authors (Adams and Rausch, 1989; Gibson, 2005). However, the presence of basal disks on the tegument or on the cirrus was observed, indicating that these organs had been spinose.

All specimens studied herein were adults with eggs, and the measurements were similar to those specimens studied by Raga et al. (1994). A valuable diagnostic feature of *S. pontoporiae* is the sucker ratio which, after accounting for variation in total body length, presented a pattern of 1:1.5–3.0 in all 95 speci-



FIGURES 9–11. *Synthesium tursionis* from *Tursiops truncatus*. (9) Total body, ventral view. (10) Terminal part of cirrus, confocal microscopy. (11) Detail of cirrus sac. Scale bars: Figs. 9, 11 = 1 mm; Fig. 10 = 100 μ m.



FIGURES 12–14. *Synthesium seymouri* n. comb. from *Delphinapterus leucas*. (12) Total body, ventral view. (13) Detail of cirrus sac. (14) Detail of vitellarium arranged in radial dendritic bunches of follicles. Scale bars: Fig. 12 = 2 mm, Fig. 13 = 1 mm, Fig. 14 = 100 μ m.

mens from the 6 sampled areas. The minimum sucker ratio was found in smaller specimens from the Paraná area. The sucker ratio of *S. tursionis* was 1:0.8–1.2 and that of *S. seymouri* was 1:0.5–0.7, which differed from *S. pontoporiae* in which the ventral sucker can be up to 3 times wider than the oral sucker.

The oral suckers of *S. pontoporiae*, *S. tursionis*, and *S. seymouri* are subterminal. However, the round shape of the pharynx of *S. seymouri* differed greatly from that of *S. pontoporiae* and *S. tursionis*, which are pyriform; in *S. tursionis*, the slender anterior part of the pharynx was equal in length to the broad posterior part, while in *S. pontoporiae* the anterior part was shorter than the posterior part. Gibson (2005) stated that the 'prepharynx may envelop anterior pharynx' in *Synthesium*; however, in a few specimens of *S. pontoporiae*, we observed the prepharynx enveloping the anterior part of the pharynx, but we interpreted this as being due to body contraction.

The original description of the cirrus sac of *S. pontoporiae* was not given in detail. The cirrus sac was elongate-claviform in the 3 presently studied species and extended dorsally to the ventral sucker, to surface via the genital atrium. Similarly, in these 3 species the seminal vesicle occupies the posterior part of the cirrus sac; the pars prostatica was also tubular and continued as the ejaculatory duct within the cirrus, to open into the genital atrium. The cirrus sacs of *S. tursionis* and *S. seymouri* are tubular, unlike that of *S. pontoporiae*, which has a pyriform, apparently permanent, proximal region and a flexible, tubular distal region, formed by evagination of the ejaculatory duct that extends through the genital pore.

The testes of *S. pontoporiae* were described as oval but, in fact, their shape varied from oval to lobed (generally up to 5 lobes). The variation in testicular shape is described in Table II; based on testis position (anterior/posterior) and shape (oval, wavy, lobed), the combination of oval/lobed was most common, except in specimens from São Paulo South, where wavy/wavy or lobed testes were the most common. The transition of testicular shape (oval – wavy – lobed) may be related to maturation and, if so, the posterior testis probably matures first, since the oval/oval and lobed/lobed combinations were rare. However, this hypothesis is not entirely supported by our material, since some of the larger individuals still had anterior oval and posterior lobed testes. Further studies are necessary to clarify this pattern.

The testes were nearly situated in the middle third of body in the 3 presently studied species. The variation in testicular shape from oval to lobed was observed in *S. pontoporiae* and *S. tursionis*, as reported by Fernández et al. (1994), but in *S. seymouri*, both testes were oval.

The vitellarium of *S. pontoporiae* formed small follicles in lateral fields of the body from the level of the seminal vesicle to the posterior extremity of the body and did not form dendritic radial bunches. In *S. tursionis*, the arrangement was similar, but follicles began posterior to the cirrus sac and extended to the posterior extremity of the body. *Synthesium seymouri* differed in that the follicular arrangement was in the form of radial dendritic bunches in lateral fields of the body from the level of the testes to the posterior end of the body.

Eggs of *S. pontoporiae* were similar in size to eggs of *S. tursionis* (46–60 × 23–28 vs. 51–55 × 28–32, respectively). This was one of the most conserved characters observed by Fernández et al. (1995) when they studied the biometric vari-

ability of *S. tursionis*. Eggs of *S. seymouri* are much larger (83–97 × 51–55).

Synthesium pontoporiae is, therefore, characterized by a sucker ratio of 1:1.5–3.0, testicular shape ranging from oval to lobed, a cirrus with a pyriform proximal region and flexible, tubular distal region formed by the evagination of the ejaculatory duct that extends through the genital pore, and a vitellarium in the form of small follicles situated between the level of the seminal vesicle and the posterior extremity of the body, and not forming dendritic radial bunches. This species is known to exclusively parasitize *P. blainvillei* in south Atlantic waters.

The generic diagnosis of *Synthesium* of Gibson (2005) needs to be amended to include characteristics of the suckers of *S. pontoporiae* as follows: suckers well developed; oral sucker smaller, similar in size or larger than ventral sucker; ventral sucker in first quarter of body. The other species of the genus require review so that a full taxonomic key can be accomplished.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Instituto Oswaldo Cruz (IOC) for providing a Ph.D. scholarship to J. Marigo; and the Cetacean Society International, the Society for Marine Mammalogy, Yaqu Pacha, Project AWARE- PADI, Fundação O Boticário de Proteção à Natureza and PROBIO/FNMA for financial support. We also thank those who provided intestines for parasite sampling: Projeto BioPesca, SP (C. P. Bertozzi, V. Ruoppolo, J. A. Ribeiro, J. V. S. Lima, M. B. Alonso, F. Marcatto, and B. Henning); Instituto Terra & Mar, São Paulo (S. P. Souza); Instituto de Pesquisas de Cananéia (IPeC); Centro de Estudos do Mar (CEM-UFPR) (F. C. W. Rosas, M. R. Oliveira); Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) (M. J. Cremer); Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) (A. S. Barreto); Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS-CECLIMAR-UFRGS) (D. Danilewicz, I. B. Moreno); Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" (CONICET) (L. Capozzo). Patricia Pilitt, at the U.S. National Parasite Collection, Beltsville, Maryland, kindly provided the paratype of *S. pontoporiae* (USNPC 82916) for study. We thank Dr. Marcelo Pelajo and Bernardo Pascarelli, IOC, for laser scanning electron microscopic facilities.

LITERATURE CITED

- ADAMS, A. M., AND R. L. RAUSCH. 1989. A revision of the genus *Orthosplanchnus* Odhner, 1905 with consideration of the genera *Odhneriella* Skriabin, 1915 and *Hadwenius* Price, 1932 (Digenea: Campulidae). *Canadian Journal of Zoology* **67**: 1268–1278.
- ANDRADE, A. L. V., M. C. PINEDO, AND J. PEREIRA, JR. 1997. The gastrointestinal helminths of franciscana, *Pontoporia blainvillei*, in Southern Brazil. Report of the International Whaling Commission **47**: 669–673.
- AZNAR, F. J., J. A. RAGA, J. CORCUERA, AND F. MONZÓN. 1995. Helminths as biological tags for franciscana (*Pontoporia blainvillei*) (Cetacea, Pontoporiidae) in Argentinian and Uruguayan waters. *Mammalia* **59**: 427–435.
- FERNÁNDEZ, M., J. A. BALBUENA, J. F. PERTUSA, AND J. A. RAGA. 1995. Biometric variability of *Hadwenius tursionis* (Marchi, 1873) (Digenea, Campulidae) from the intestine of the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). *Systematic Parasitology* **30**: 67–76.
- , AND J. A. RAGA. 1994. *Hadwenius tursionis* (Marchi, 1873) n. comb. (Digenea, Campulidae) from the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) in the western Mediterranean. *Systematic Parasitology* **28**: 223–228.
- GIBSON, D. I. 2002. Trematodes in marine mammals: Morphology, systematics and origins. The Tenth International Congress of Parasitology, Monduzzi Editore (ed.). MEDIMOND Inc., Vancouver, Canada, p. 59–63.
- . 2005. Family Brachycladiidae Odhner, 1905. In *Keys to the*

- Trematoda, Vol. 2, A. Jones, R. A. Bray and D. I. Gibson (eds.). CAB International and the Natural History Museum, London, U.K., p. 641–652.
- IBAMA. 1997. Mamíferos aquáticos do Brasil: Plano de ação. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília, Brazil, 80 p.
- . 2001. Mamíferos aquáticos do Brasil: Plano de ação, versão II, 2nd ed. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília, Brazil, 102 p.
- ICZN (INTERNATIONAL COMMISSION ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE). 1999. International Code of Zoological Nomenclature, 4th ed. The International Trust for Zoological Nomenclature, London, U.K., 306 p.
- PRICE, E. W. 1932. Trematode parasites of marine mammals. Proceedings of the United States National Museum **81**: 1–68.
- RAGA, J. A., J. AZNAR, J. A. BALBUENA, AND M. D. DAILEY. 1994. *Hadwenius pontoporiae* sp. n. (Digenea: Campulidae) from the intestine of franciscana (Cetacea: Pontoporiidae) in Argentinian waters. Journal of the Helminthological Society of Washington **61**: 45–49.
- SECCHI, E. R., D. DANILEWICZ, P. H. OTT, R. RAMOS, M. LAZARO, J. MARIGO, AND J. Y. WANG. 2002. Report of the working group on stock identity (Report of the fourth workshop for the coordinated research and conservation of the franciscana). Latin American Journal of Aquatic Mammals **1**: 47–54.
- SICILIANO, S., A. P. M. DI BENEDITTO, AND R. M. A. RAMOS. 2002. A toninha, *Pontoporia blainvillei* (Gervais and d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea, Pontoporiidae), nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, costa sudeste do Brasil: Caracterização dos habitats e fatores de isolamento das populações. Boletim do Museu Nacional, Serie Zoologia, **476**: 1–15.
- STUNKARD, H. W., AND C. H. ALVEY. 1930. The morphology of *Zalophotrema hepaticum*, with a review of the trematode family Fasciolidae. Parasitology **22**: 328–333.

3.2. Artigo 2

Elsevier Editorial System(tm) for International Journal for Parasitology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: The *Synthesium* genetic relationship within Brachycladiidae Odhner, 1905 (Digenea) based on nuclear and mitochondrial genes.

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Systematics and Evolution

Keywords: Brachycladiidae; *Synthesium*; 18S rRNA; ND3 mtDNA; Phylogeny

Corresponding Author: Miss Juliana Marigo, MSc DVM

Corresponding Author's Institution: IOC-FIOCRUZ

First Author: Juliana Marigo, MSc DVM

Order of Authors: Juliana Marigo, MSc DVM ; Alena M Iniguez; Cristiane C Thompson; Cláudia P Santos; Ana Carolina P Vicente

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: The study of Brachycladiidae has been limited by the difficulty of accessing the parasites from these marine mammal hosts and as consequence there is a paucity of genetic information available. Here new 18S rRNA sequences of *Synthesium pontoporiae* and *S. tursionis* were incorporated in the phylogeny of the family Brachycladiidae Odhner, 1905 and the new ND3 mtDNA sequence of *S. pontoporiae* was compared to that of other brachycladiids. Our molecular data confirms that *Synthesium* belongs to Brachycladiidae. Using the 18S rRNA sequences brachycladiids and acanthocolpids formed clusters associated with marine mammals and fish hosts, respectively. Our ND3 mtDNA gene data shows that the "intestinal parasites", *Synthesium*,

define a cluster apart from the other genera, *Zalophotrema*-*Nasitrema*-*Campula*-*Orthosplanchnus*-*Oschmarinella*-*Brachycladium*, the "extra-intestinal parasites". Our work contributes with fundamental genetic information on *S. pontoporiae*, exclusive parasite of the endangered dolphin, *Pontoporia blainvillei*, endemic and restricted to South Atlantic.

Rio de Janeiro 6th May 2009.

Editor

International Journal for Parasitology

Dear Dr. Loukas,

We would like to submit to **International Journal for Parasitology** the manuscript entitled “**The *Synthesium* genetic relationship within Brachycladiidae Odhner, 1905 (Digenea) based on nuclear and mitochondrial genes.**”

The family Campulidae Odhner, 1926, the marine mammal's parasites family, taxonomic position is based on morphological characters and has been discussed along the years. At present, the taxonomy of the Brachycladiidae follows Gibson (2005) with two subfamilies: Brachycladiinae (including *Synthesium*, *Hunterotrema*, *Campula*, *Oschmarinella*, *Orthosplanchnus*, *Odhneriella*, *Zalophotrema* and *Brachycladium*) and Nasitrematinae (including *Nasitrema* Ozaki, 1935 and *Cetitrema* Skrjabin, 1970). This family taxonomy is problematic because good specimens are difficult to obtain from decomposed/frozen marine mammal hosts and the interpretation of morphology is complicated. Therefore molecular studies such as ours, although using the small sample size available, provide basic information essential to the understanding of their taxonomy and phylogeny.

In this manuscript we present new information of Brachycladiidae phylogeny, based on two molecular markers: the 18S rDNA and ND3 mt DNA gene. We include the intestinal parasites of the genus *Synthesium*, represented by two species occurring in South American dolphins. *Synthesium pontoporiae* that is exclusive of the endangered dolphin *Pontoporia blainvillei* and, in the other hand, *Synthesium tursionis* that occurs in a large

number of odontocetes. This work established the *Synthesium* position among Brachycladiidae and provides evidence of associations between different digeneans and site of infection.

We also submit, as Supplementary material, the Figure 2A and B, the phylogenetic trees obtained using the maximum parsimony method for both markers (18S rRNA and ND3 mtDNA).

We confirm that we wrote the manuscript and accept responsibility for its contents.

Sincerely,

J. Marigo

A.M. Iñiguez

C.C.Thompson

C.P.Santos

A.C.P.Vicente

J. Marigo (corresponding author: juliana@marigo.com.br)

Laboratório de Genética Molecular e Microorganismos; Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, 21045-900, Brazil, Projeto BioPesca, Rua Paraguai 241, Praia Grande, São Paulo, 11702-070, Brazil.

* Manuscript

[Click here to view linked References](#)

1 **Running title: *Synthesium* genetic relationship**

2 **The *Synthesium* genetic relationship within Brachycladiidae Odhner, 1905 (Digenea) based on**
3 **nuclear and mitochondrial genes.**

4 **J. Marigo^{1,2,3*}**

5 1-Laboratório de Genética Molecular e Microorganismos. 2- Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde
6 Ambiental. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. 3-Projeto BioPesca, Praia Grande, São Paulo,
7 Brazil.

8

9 **A.M. Iñiguez¹**

10 1-Laboratório de Genética Molecular e Microorganismos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

11

12 **C.C.Thompson¹**

13 1-Laboratório de Genética Molecular e Microorganismos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

14

15 **C.P.Santos²**

16 2-Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro,
17 Brazil.

18

19 **A.C.P.Vicente¹**

20 1-Laboratório de Genética Molecular e Microorganismos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

21

22 ***Corresponding author:**

23 1-Laboratório de Genética Molecular e Microorganismos. 2- Laboratório de Avaliação e Promoção
24 da Saúde Ambiental. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. 3-Projeto BioPesca. Av. Brasil 4365,
25 Manguinhos, Rio de Janeiro, 21045-900, Brazil. Tel: + 55 21 3865 8168. Fax: + 55 21 2260 4282.

26 Email: jumarigo@hotmail.com; jumarigo@ioc.fiocruz.br

27

28

29 **ABSTRACT**

30 The study of Brachycladiidae has been limited by the difficulty of accessing the parasites from
31 these marine mammal hosts and as consequence there is a paucity of genetic information available.
32 Here new 18S rRNA sequences of *Synthesium pontoporiae* and *S. tursionis* were incorporated in the
33 phylogeny of the family Brachycladiidae Odhner, 1905 and the new ND3 mtDNA sequence of *S.*
34 *pontoporiae* was compared to that of other brachycladiids. Our molecular data confirms that
35 *Synthesium* belongs to Brachycladiidae. Using the 18S rRNA sequences brachycladiids and
36 acanthocolpids formed clusters associated with marine mammals and fish hosts, respectively. Our
37 ND3 mtDNA gene data shows that the “intestinal parasites”, *Synthesium*, define a cluster apart
38 from the other genera, *Zalophotrema-Nasitrema-Campula-Orthosplanchnus-Oschmarinella-*
39 *Brachycladium*, the “extra-intestinal parasites”. Our work contributes with fundamental genetic
40 information on *S. pontoporiae*, exclusive parasite of the endangered dolphin, *Pontoporia blainvillei*,
41 endemic and restricted to South Atlantic.

42

43

44

45

46

47

48

49 **Key words:**

50 Brachycladiidae

51 *Synthesium*

52 18S rRNA

53 ND3 mtDNA

54 Phylogeny

55 **Introduction**

56 Digeneans are platyhelminths with a complex life cycle that may have one to four
57 invertebrate and vertebrate hosts and a plasticity that has allowed the infection of a vast number of
58 species (Cribb *et al.* 2000; Cribb *et al.* 2003).

59 The digenean family Brachycladiidae Odhner, 1905, formerly known as Campulidae,
60 consists of parasites of marine mammals with unstable taxonomy and a convoluted history (Marigo
61 *et al.* 2008). This family shares a common origin with Acanthocolpidae Lühe, 1906, which are
62 currently recognized as mainly parasites of fish. The close relationship between Brachycladiidae
63 and Acanthocolpidae has been supported by recent morphological and molecular studies and the
64 families were even suggested as a synonym (Bray *et al.* 2005).

65 At present, the taxonomy of the Brachycladiidae follows Gibson (2005) with 2 subfamilies,
66 Brachycladiinae and Nasitrematinae. The Brachycladiinae includes *Synthesium* Stunkard and
67 Alvey, 1930 (= *Hadwenius* Price, 1932; *Leucasiella* Krotov & delyamure, 1952), *Hunterotrema*
68 McIntosh, 1960, *Campula* Cobbold, 1858, *Oschmarinella* Skrjabin, 1947, *Orthosplanchnus*
69 Odhner, 1905, *Odhneriella* Skrjabin, 1915, *Zalophotrema* Stunkard & Alvey, 1929, and
70 *Brachycladium* Looss, 1899 (= *Lecithodesmus* Braun, 1902). Included in the Nasitrematinae are
71 *Nasitrema* Ozaki, 1935 and *Cetitrema* Skrjabin, 1970. These genera can be found in marine
72 mammals at different sites of infection, for example, *Zalophotrema* in bile ducts of cetaceans and
73 pinnipeds; *Campula* in liver, bile ducts and pancreatic ducts of odontocetes; *Nasitrema* in nasal
74 sinuses and *Synthesium* in the intestines of Cetacea (Gibson, 2005).

75 The genus *Synthesium*, comprises eight species of intestinal parasites of odontocetes: *S.*
76 *tursionis* (Marchi, 1873); *S. pontoporiae* (Raga, Aznar, Balbuena and Dailey, 1994); *S. seymouri*
77 (Price, 1932); *S. elongatus* (Osaki, 1935); *S. nipponicus* Yamaguti, 1951; *S. mironovi* (Krotov and
78 Delyamure, 1952); *S. subtilis* (Skrjabin, 1959), *S. delamurei* (Raga and Balbuena, 1988) (Raga *et*
79 *al.* 1994). *Tursiops truncatus* Montagu, 1821 is the type-host for *Synthesium tursionis* (Marchi,
80 1873), which is the most cosmopolitan species and parasitize the largest number of odontocetes

81 species (Fernandez *et al.* 1998a; Marigo *et al.* 2008). *Synthesium pontoporiae*, is known exclusively
82 from the endangered dolphin *Pontoporia blainvillei* Gervais and d'Orbigny, 1844 in South Atlantic
83 waters. Its was recently morphologically redescribed (Marigo *et al.* 2008), however no molecular
84 data is available.

85 The first study to address the genetic relationships of Digenea was based on the complete
86 18S rRNA (Olson and Tkach, 2005). The 18S rRNA gene is approximately 1800 nucleotides and
87 variation in length has been observed in protists, plathyhelminths, and arthropods (Redmond and
88 McCormack, 2008). For the Brachycladiidae, the 18S gene and nicotinamide adenine dinucleotide
89 dehydrogenase subunit 3 gene (ND3) sequences has been used in previous phylogenetic studies
90 (Fernandez *et al.* 1998a; 1998b).

91 The aim of this work was to establish the position of the *Synthesium pontoporiae* and *S.*
92 *tursionis* within the Brachycladiidae based on two molecular markers: the 18S rRNA and ND3
93 mtDNA sequences.

94

95 **Material and methods**

96 *Synthesium pontoporiae* and *S. tursionis* were collected from the intestines of *Pontoporia*
97 *blainvillei* and *Tursiops truncatus* stranded or bycaught off the Southern Brazilian coast.
98 Trematodes were fixed and conserved in 70% ethanol. DNA was extracted following the QIAamp
99 DNA Mini Kit (QIAGEN®) protocol.

100 The 18S rRNA gene was amplified by PCR using 2 sets of primers: a) 18SF 5'-
101 CGTATCTTTCAAATGTCTGCCC-3' and 18SR 5'-CCGATGACCTTGCTAAACC-3' (1450bp)
102 (Fernandez *et al.* 1998b) and b) SSUA 5'-AAAGATTAAGCCATGCATGCATG-3' and SSU22R
103 5'-GCCTGCTGCCTTCCTTGGA-3' (400bp) (Doris and Blaxter, 2000).

104 The ND3 mtDNA gene was amplified by PCR using 2 sets of primers: a) ND3A 5'-
105 GCGTTAGCAGGATCCTGTGATATAG-3' and ND3B 5'-
106 CCAAAGCTTAAATCATCGTTAGCAG-3' and b) ND3C 5'-

107 CTACTAGTGAGATTGATCT(T/C)CGTCGGT-3' and ND3D 5'-
108 CTACTAGTCCCCTCAAC(G/A)TAACC(T/C)T-3' (Fernandez *et al.* 1998a). Both fragments
109 included one tRNA sequence prior to the ND3 mtDNA gene sequence. Analysis was performed
110 using only the ND3 mtDNA gene sequence.

111 Amplifications reactions contained 5.0 µl of DNA, 200.0 mM of dNTPs, 200.0 ng of each
112 primer, 3.0mM of MgCl₂ and 0.3µl of Taq DNA polymerase, in a final volume of 50µl, under 40
113 cycles at 94°C, 5min; 60°C, 40sec; 72°C, 40sec; and 1 cycle 72°C, 2min. PCR amplicons were
114 purified directly using Perfect Cleanup (Eppendorf). DNA sequencing was performed in ABI
115 PRISM 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) from both strands using the PCR primers.
116 Raw sequences were transferred to DNASTAR software (Lasergene) where consensus sequences
117 were determined. The sequences were aligned on CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) and
118 phylogenetic analyses were conducted using MEGA version 4.0 (Tamura *et al.* 2007). The number
119 of base differences per site was based on the pairwise analysis. The phylogenetic inference was
120 made based on the neighbor-joining (NJ) genetic distance method (Saitou & Nei, 1987) and
121 maximum parsimony (MP) (Fitch, 1971). Distance estimations were obtained according to the
122 Kimura two-parameter (Kimura, 1980) model for 18S rRNA gene sequences and Tamura three-
123 parameter (Tamura, 1992) for ND3 mtDNA gene sequences. The reliability of each tree topology
124 was assessed by analyzing 2000 bootstrap replicates.

125 The analysis was made using 18S rDNA sequences of digeneans from the families:
126 Brachycladiidae (*Synthesium*, *Zalophotrema* and *Nasitrema*), Acanthocolpidae (*Stephanostomum*,
127 *Monostephanostomum*, *Pleorchis*, and *Tormopsolus*), and as outgroup *Fasciola hepatica* and
128 *Schistosoma mansoni*. The ND3 mtDNA gene sequences analyzed were from: Brachycladiidae
129 (*Synthesium*, *Zalophotrema*, *Nasitrema*, *Campula*, *Orthosplanchnus*, *Oschmarinella* and
130 *Brachycladium=Lecithodesmus*), and as outgroup *F. hepatica* and *S. mansoni*. (available in
131 GenBank, Table 1). The DNA G + C content was calculated using MEGA version 4.0.

132 The new 18S rRNA gene nucleotide sequences reported in this paper for *S. pontoporiae* and
133 *S. tursionis* are available in GenBank under accession numbers FJ357162, FJ357163 and the *S.*
134 *pontoporiae* ND3 mtDNA gene nucleotide sequence under number FJ829472.

135

136 **Results**

137 Almost complete 18S rRNA gene (1721bp) and ND3 mtDNA sequences (331bp) from
138 *Synthesium pontoporiae* and *S. tursionis* were determined and the genetic analysis was performed
139 using Brachycladiidae and Acanthocolpidae sequences available on the GenBank. 18S rDNA gene
140 sequence similarity among brachycladiids was 99% and the two *Synthesium* species sequences
141 differed only in one position (G92A). Divergence varies from 2-4% in relation to Acanthocolpidae
142 genera and in relation to outgroups *S. mansoni* and *F. hepatica* was 5-10%. The *Synthesium* cluster
143 was characterized by ten genetic signatures on the 18S rRNA sequence (Table 2) when compared
144 to *Nasitrema globicephalae* and *Zalophotrema hepaticum*. Based on the primary sequence of 18S
145 rRNA of Schistosoma, most of the *Synthesium* signatures lie on the V7 variable region (Ali *et al.*,
146 1991). The ND3 mtDNA gene distinguished the *Synthesium* cluster from the other brachycladiids
147 by five genetic signatures in only 331bp (Table 2). The similarity among brachycladiids using this
148 marker was 78-99% and between the two *Synthesium* species of 86%, while the family divergence
149 in relation to outgroups *F. hepatica* and *S. mansoni* was 24-46%.

150 The Brachycladiidae 18S rDNA gene G+C content ranged from 49-51% and for the
151 Acanthocolpidae was 51%. The Brachycladiidae ND3 mtDNA gene G+C content ranged from 36-
152 38%.

153 The 18S neighbor-joining and maximum parsimony analysis defined two well supported
154 family clusters, Brachycladiidae, marine mammals parasites and Acanthocolpidae, fish parasites
155 (Figure 1A) (Figure 2A Supplementary). The ND3 mtDNA gene analysis from Brachycladiidae
156 family, placed the *Synthesium* in a distinct cluster segregating intestinal from extra-intestinal
157 parasites (Figure 1B) (Figure 2B Supplementary).

158 **Discussion**

159 The study of Brachycladiidae has been limited by the difficulty of accessing specimens from
160 their marine mammal hosts and as a consequence, there is a paucity of genetic information
161 available. Most of gene sequences of brachycladiids used in this study were from type species of the
162 respective genera: *S. tursionis* intestinal parasite of odontocetes; *Z. hepaticum* bile-ducts parasite
163 mainly of pinnipeds. *C. oblonga* found in liver, bile-ducts and pancreatic ducts of odontocetes and
164 *Nasitrema* is a parasite of nasal sinuses parasites of Cetacea (Gibson, 2005).

165 In this study we add to the limited repertoire of Brachycladiidae gene sequences new 18S
166 rRNA gene and ND3 mtDNA gene sequences, two genes from *S. pontoporiae*, a trematode of the
167 endangered specie of dolphin (*Pontoporia blainvillei*), endemic and restricted to South Atlantic.
168 The position of *Synthesium* among the Brachycladiidae is now confirmed by the 18S rRNA data
169 and based on ND3 mtDNA gene sequence the hypothesis of the basal position of *Synthesium*
170 species among Brachycladiidae (Fernandez *et al.* 1998a) is supported.

171 Additionally, our 18S rDNA analysis confirms the closest relationship between
172 brachycladiids and acanthocolpids, mentioned before as sister groups with a probable common
173 origin resultant of host switching (Bray *et al.* 2005). Those authors used *Z. hepaticum* as the only
174 brachycladiid representative and mentioned that a larger sample of brachycladiids would be needed
175 in order to have a robust analysis. Using five brachycladiids species we could clearly divide the two
176 families in separated clusters, characterized by marine mammals and fish parasites.

177 The life cycle of acanthocolpids includes marine gastropods as first intermediate host and
178 mainly fishes as second intermediate and definitive hosts. In this context, the hypothesis would be
179 that the trematodes whose cycle ended in fishes were able to switch to mammalian hosts, with the
180 adaptation of a parasite in a new host, often speciating during the process (Bray *et al.* 2005;
181 Fernandez *et al.* 1998b; Olson *et al.* 2003).

182 Interestingly the two clusters defined with ND3 mtDNA gene analysis of brachycladiids are
183 characterized in terms of infection site in the definitive host. *S. pontoporiae* and *S. tursionis* are

184 intestinal parasites whereas *N. globicephalae*, *C. oblonga*, *Z. hepaticum*, *Z. atlanticum*, *O.*
185 *fraterculus*, *O. rochebruni* and *Brachycladium* sp parasitize other sites (nasal sinuses, liver, bile
186 and pancreatic ducts).

187 Within the Brachycladiidae, *Synthesium* exhibits a worldwide distribution and occurs in a
188 number of odontocetes families (Pontoporiidae, Delphinidae, Monodontidae and Phocoenidae).
189 These features suggest a long period of host-parasite interactions, with many potential hosts
190 captures among different odontocetes groups (Fernandez *et al.* 1998a). In addition, most digeneans
191 occur in the gut, primarily in the upper intestine where they browse on mucus, epithelial cells and
192 sometimes blood, and species established in extra-intestinal sites could be relatively recent
193 members that adopted new forms of nutrition (Brooks *et al.* 1985; Cribb *et al.* 2002). Consequently
194 this possible older association of *Synthesium* is in agreement with the fact that they are intestinal
195 parasites and the intestines are the primary sites of infection for digeneans. Certainly, new
196 brachycladiid sequences should strengthen our inferences and several interesting evolutionary
197 questions could be pursued in light of this work.

198

199 **Acknowledgements**

200 This work is part of the PhD Dissertation of J. Marigo that acknowledges the IOC grant. We
201 thank Koko Otsuki and Fernanda Freitas for their technical assistance. Also Heloisa M. Diniz
202 (Laboratório de Produção e Tratamento de Imagem-IOC) for graphic assistance and
203 PDTIS/FIOCRUZ genomic platform for DNA sequencing.

204

205

206

207

208

209 **References**

- 210 Ali, O.P., Simpson, A.J.G., Allen, R., Waters, A.P., Humphries, C.J., Johnston, D.A.,
211 Rollinson, D., 1991. Sequence of a small subunit rRNA gene *Schistosoma mansoni* and its use in
212 phylogenetic analysis. *Mol. Bioch. Parasitol.* 46, 201-208
- 213 Bray, R.A., Webster, B.L., Bartoli, P., Littlewood, D.T., 2005. Relationships within the
214 Acanthocolpidae Lühe, 1906 and their place among the Digenea. *Acta Parasitol.* 59, 4, 281-291.
- 215 Brooks, D.R., O'Grady, R.T., Glen, D.R., 1985. Phylogenetic analysis of the Digenea
216 (Platyhelminthes: Cercomeria) with comments on their adaptative radiation. *Can. J. Zool.* 63,411-
217 443.
- 218 Cribb, T.H., Bray, R.A., Littlewood, T.J., Pichelin, S.P., Herniou, E.A., 2000. Chapter 16:
219 The Digenea. In: Littlewood, T.J., Bray, R.A. (Ed.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*. CRC
220 Press, pp.168-185.
- 221 Cribb, T.H., Chisholm, L.A., Bray, R.A., 2002. Diversity in the Monogenea and Digenea:
222 does lifestyle matter? *Int. J. Parasitol.* 32, 321-328.
- 223 Cribb, T.H.C., Bray, R.A., Olson, P.D., Littlewood, D.T.J., 2003. Life cycle evolution in the
224 Digenea: a new perspective from phylogeny. *Adv. Parasitol.* 54, 197-254.
- 225 Dorris, M., Blaxter, M., 2000. The small subunit ribosomal RNA sequence of *Strongyloides*
226 *stercoralis*. *Int. J. Parasitol.* 30, 939-941.
- 227 Fernandez, M., Aznar, F.J., Latorre, A., Raga, J.A., 1998a. Molecular phylogeny of the
228 families Campulidae and Nasitremitidae (Trematoda) based on mtDNA sequence comparison. *Int.*
229 *J. Parasitol.* 28, 767-775.
- 230 Fernandez, M., Littlewood, D.T.J., Latorre, A., Raga, J.A., Rollinson, D., 1998b.
231 Phylogenetic relationships of the family Campulidae (Trematoda) based on 18S rRNA sequences.
232 *Parasitology* 117, 383-391.
- 233 Fitch, W. M., 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a
234 specified tree topology. *Syst. Zool.* 20, 406-416.

235 Gibson, D. I., 2005. Family Brachycladiidae Odhner, 1905. In: Jones, A., Bray, R.A.,
236 Gibson, D.I. (Ed). Keys to the Trematoda, Vol. 2. CAB International and the Natural History
237 Museum, London, U.K., pp. 641-652.

238 Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of substitutions
239 through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16, 11-120.

240 Marigo, J., Vicente, A.C.P., Valente, A.L.S., Measures, L., Santos, C.P., 2008.
241 Redescription of *Synthesium pontoporiae* n. comb. with notes on *S. tursionis* and *S. seymouri* n.
242 comb. (Digenea: Brachycladiidae Odhner, 10905). J. Parasitol. 94, 2, 505-514.

243 Olson, P.D., Cribb, T.H., Tkach, V.V., Bray, R.A., Littlewood, D.T.J., 2003. Phylogeny and
244 classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). Int. J. Parasitol. 33, 733-755.

245 Olson, P.D., Tkach V.V., 2005. Advances and trends in the molecular systematics of the
246 parasitic Platyhelminthes. Adv. Parasitol. 60, 165-243.

247 Raga, J.A., Aznar, J., Balbuena, J.A., Dailey, M. D., 1994. *Hadwenius pontoporiae* sp. n.
248 (Digenea: Campulidae) from the intestine of Franciscana (Cetacea: Pontoporiidae) in Argentinian
249 waters. J. Helminth. Soc. Wash. 61, 45-49.

250 Redmond, N.E., McCormack, G. P., 2008. Large expansion segments in 18S rDNA support
251 a new sponge clade (Class Demospongiae, Order Haplosclerida). Mol. Phylogenet. Evol. 47, 1090–
252 1099.

253 Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing
254 Phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425.

255 Tamura, K., 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are
256 strong transition-transversion and G + C-content biases. Mol. Biol. Evol. 9, 678-687.

257 Tamura, K., Dudley J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary
258 Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596-1599

259 Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. Clustal W: improving the sensitivity of
260 the progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap
261 penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

262

263

264

265

266 **Legends of Figures:**

267

268 Figure 1: A) Phylogenetic tree based on 18S rRNA sequences (1721bp) of 10 Digenean species
269 using the neighbour-joining method. Distance estimations were obtained by Kimura two-parameter
270 model. Bootstrap percentages after 2000 simulations are shown at internodes. Bar, 1% estimated
271 sequence divergence. B) Phylogenetic tree based on ND3 mtDNA sequences (331bp) of 10
272 Digenean species using the neighbour-joining method. Distance estimations were obtained by
273 Tamura three-parameter model. Bootstrap percentages after 2000 simulations are shown at
274 internodes. Bar, 5% estimated sequence divergence.

275

276 Figure 2 (Supplementary material): A) Phylogenetic tree based on 18S rRNA sequences (1721bp)
277 of 11 Digenean species using the maximum parsimony method. B): Phylogenetic tree based on
278 ND3 mtDNA sequences (331bp) of 10 Digenean species using the maximum parsimony method.
279 Bootstrap percentages after 2000 simulations are shown at internodes.

280

281

282

283

284

285 Table 1: Digenean species analyzed 18S rRNA and ND3 mtDNA gene sequence GenBank
 286 accession number.

Species and classification	18S rRNA GenBank accession	ND3 mt DNA GenBank acession
Family Brachycladiidae		
<i>Synthesium pontoporiae</i>	* FJ357162	* FJ829472
<i>Synthesium tursionis</i>	* FJ357163	AF034552
<i>Zalophotrema hepaticum</i>	AJ2248844	**
<i>Zalophotrema atlanticum</i>	**	AF034551
<i>Nasitrema globicephalae</i>	AJ004968	AF034557
<i>Campula oblonga</i>	-	AF034554
<i>Orthosplanchnus fraterculus</i>	**	AF034555
<i>Oschmarinella rochebruni</i>	**	AF034556
<i>Brachycladium sp (=Lecithodesmus sp)</i>	**	AF123439
Family Acanthocolpidae		
<i>Stephanostomum pristis</i>	DQ248209	**
<i>Monostephanostomum nolani</i>	EF506762	**
<i>Pleorchis polyorchis</i>	DQ248202	**
<i>Tormopsolus orientalis</i>	DQ248204	**
Family Fasciolidae		
<i>Fasciola hepatica</i>	AJ004969	AF216697
Family Schistosomatidae		
<i>Schistosoma mansoni</i>	X53047	AF30788

287 *Sequences characterized in this study. ** Sequence not available. - Incomplete 18S rRNA

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300 Table 2: Genetic signatures of the *S.pontoporiae*-*S. tursionis* and other brachycladiids on 18S rRNA
 301 (1709bp) and ND3 mtDNA (331bp) gene sequences .

302
 303

18S nt positions	<i>S. pontoporiae</i> and <i>S. tursionis</i>	<i>N. globicephala</i> and <i>Z. hepaticum</i>	ND3 nt positions	<i>S. pontoporiae</i> and <i>S. tursionis</i>	Other Brachycladiidae
147	G	A	145	G	T
1087	C	T	147	G	T
1094	T	A	159	T	G
1412	T	C	164	A	G
1424	T	C	303	C	T
1434	-	T			
1441	A	G			
1442	T	G			
1453	C	T			
1454	A	G			

304
 305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

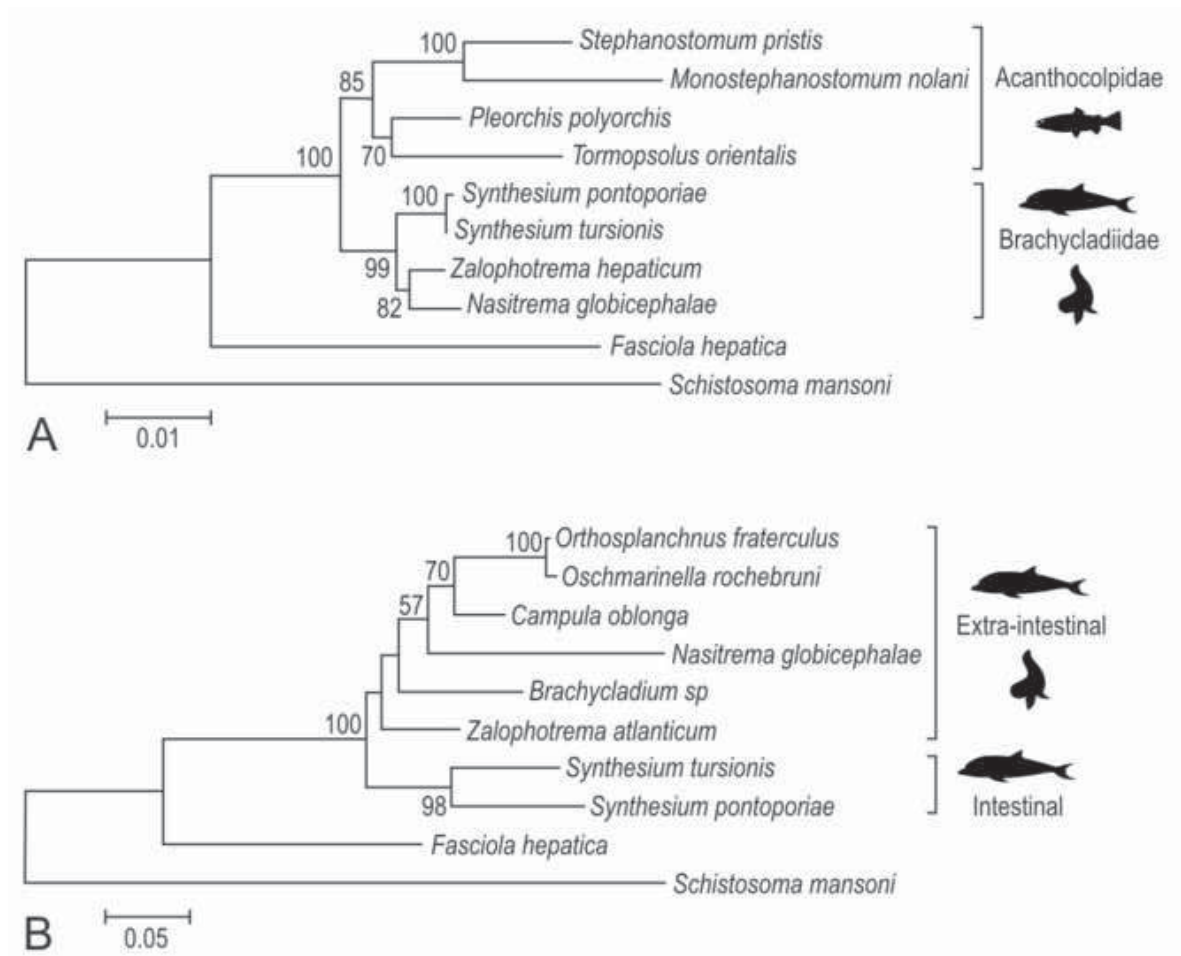
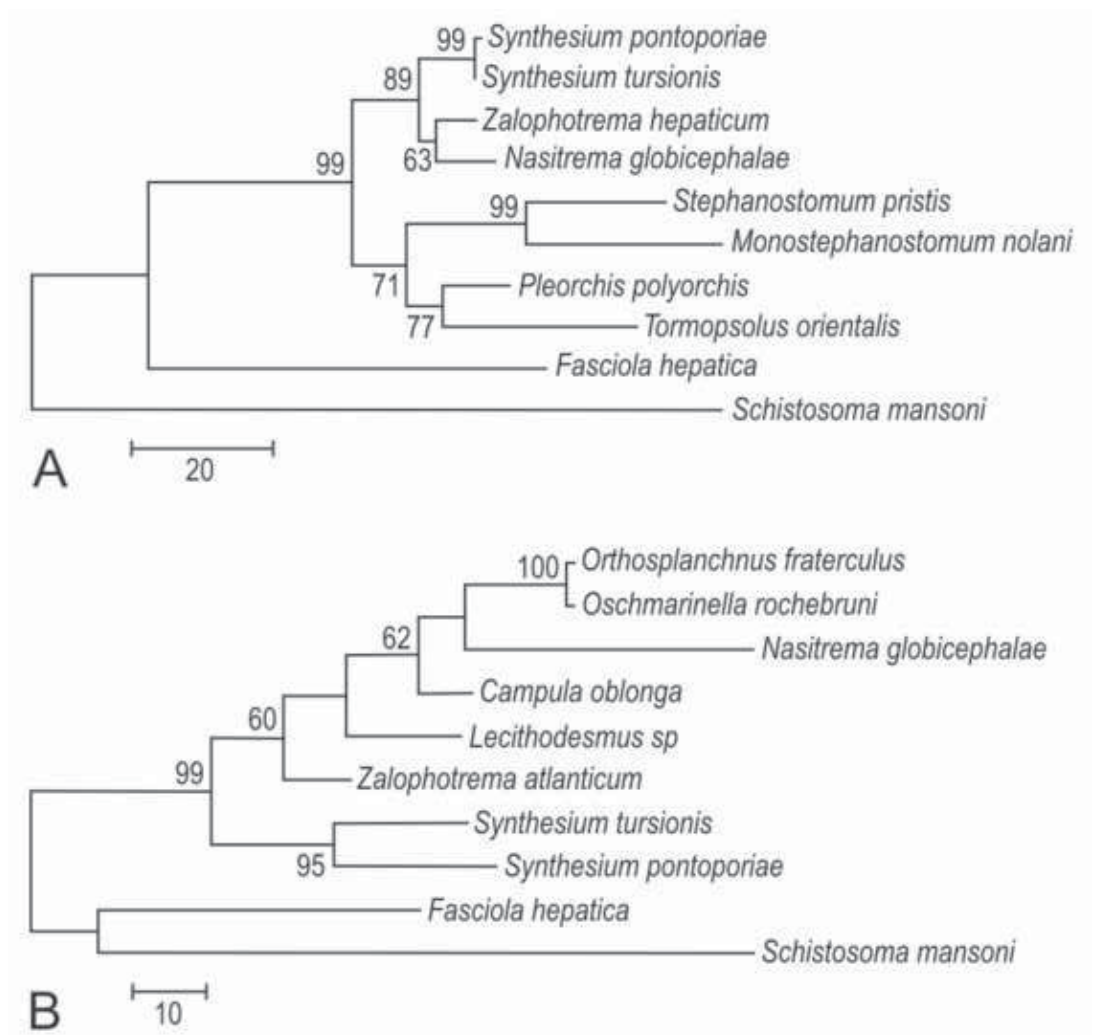


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)



3.3. Artigo 3 (Em submissão)

ITS, ND3 and COI of *Synthesium pontoporiae* (Digenea, Brachycladiidae) in prospecting for stock differentiation of their host, the endangered dolphin *Pontoporia blainvillei* (Pontoporiidae)

Juliana Marigo^{1,2,3}; Haydee A. Cunha⁴; Carolina P Bertozzi³; Shirley P Souza⁵; Fernando CW Rosas⁶; Marcia R Oliveira⁷; Marta J Cremer⁸; Andre S Barreto⁹; Larissa Oliveira¹⁰; Luis Capozzo¹¹; Ana LS Valente¹²; Cláudia P Santos²; Ana CP Vicente¹.

¹Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, ²Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. ³Projeto BioPesca, SP; ⁴Laboratório de Biodiversidade Molecular (UFRJ)/MAQUA-Laboratório de Mamíferos Aquáticos, (UERJ); ⁵Instituto Terra & Mar, SP; ⁶Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, AM; ⁷Centro de Estudos do Mar, PR; ⁸Universidade da Região de Joinville, SC; ⁹Universidade do Vale do Itajaí, SC; ¹⁰Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (CECLIMAR-UFRGS), RS; ¹¹Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" (CONICET), Argentina; ¹²Universidade Federal de Pelotas, RS.

Introduction

The franciscana, *Pontoporia blainvillei* Gervais and d'Orbigny, 1844, is a small dolphin endemic to the western South Atlantic, ranging from Espírito Santo, Brazil, to Peninsula Valdez, Argentina. By being restricted to shallow waters, this species is particularly vulnerable to anthropogenic activities. The greatest threat to *P. blainvillei* is incidental capture in coastal gillnets throughout most of its distribution. As a consequence, the franciscana is one of the most threatened small cetacean species in the western South Atlantic. However, the full impact of bycatch on populations is still unknown because of uncertainties about stock structure and lack of abundance estimates for most of the areas. These topics have been considered research priorities for this species in several meetings, workshops and action plans during the last decades (Secchi et al., 2002; 2003).

Pinedo (1991) proposed at least two different forms of *P. blainvillei* based on osteological differences: one found to the north and other to the South of Santa Catarina State. Recent studies also support the hypothesis of stock division but into four or more genetically different Evolutionarily Significant Units (Ott, 2002; Mendez et al., 2007) and four proposed management areas with different levels of incidental captures (Secchi et al., 2002; Ott et al., 2002).

Lately, more use is being made of a multidisciplinary approach to investigate host population structure, using a variety of methods including the use of biological tags. One of the strengths of biological tagging is that parasites can often be used to identify subpopulations where genetic studies fail to do so. The term "ecological stock" has been used with increasing frequency. This term is used to describe subpopulations, which are distinguished by behavioral differences, but between which there is still a considerable amount of gene flow (MacKenzie, 2008).

Thus, comparisons of infection levels of one or more species of parasites among hosts within a given geographic area can aid in the identification of populations that are segregated, potentially comprising different ecological stocks (Marigo et al., 2002). Parasites loads have been recommended (Reeves and Leatherwood, 1994; IBAMA, 1997; 2001) and used to identify ecological stocks of *P. blainvillei* corroborating with the hypothesis of segregated populations (Andrade et al., 1997; Marigo et al., 2002; Secchi et al., 2002).

Recently, studies indicated that parasite molecular data can potentially elucidate host population history or demography and can serve as useful markers to indicate host-source populations (Criscione et al., 2005, 2007). Despite the potential usefulness of parasite genetic data, there have been relatively few traditional phylogeographical studies on nonhuman parasites. Given that parasites are closely tied to their hosts, it might be expected that their hosts would share similar phylogeographical patterns. Indeed, congruence between host and parasite phylogeography has been found (see review in Criscione et al., 2005) and its degree of congruence depends on to which host in a parasite's life cycle it is compared, and on the nature of the transmission dynamics between the host and parasite. Also, if a parasite is more finely subdivided than its host, one could potentially use the genotypes of a single species of parasite to assign hosts to their population of origin with higher probabilities than using the host's own genotypes (Criscione et al., 2005; Criscione and Blouin, 2007).

According to Zarowiecki et al. (2007), there is no established precedent for trematodes as to which molecular markers should be used for population studies or other purposes. Phylogeographic studies have relied almost exclusively on partial cytochrome c oxidase I (e.g., Iwagami et al., 2003; Pongratz et al., 2003; Wickstrom et al., 2003) and, to a lesser extent, on ribosomal DNA (Attwood et al., 2002). Population genetic studies of flatworms are few, and have focused on the accumulation of data from random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses (e.g., Semyenova et al., 2003; Vilas et al., 2003; Theron et al., 2004). Targeted gene approaches have relied heavily on mtDNA markers, including COX1 or COI (e.g., Wickstrom et al., 2003), NAD1 (Criscione and Blouin, 2004) and/or multiple mt fragments (Morgan et al., 2005).

Recently, several molecular techniques have been applied for taxonomic identification of parasites (Jousson et al., 2000). For trematodes, the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA (ITS rDNA) usually distinguishes species clearly. Intraspecific variation is low but reported in a significant number of studies and information on geographical variation is limited (Nolan and Cribb, 2005).

Mitochondrial genomes of flatworms include two ribosomal genes, 12 protein-coding and 22 transfer RNA (tRNA). The pursuit of a universal DNA barcoding region has contributed to the encouragement to rely primarily (or even exclusively) on partial mitochondrial cox1 or COI, even though this marker may not be the most informative or most suitable marker for all taxa (Zarowiecki et al., 2007).

From the Brachycladiidae, the marine mammal parasites, only 18S gene and nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 3 gene (ND3) sequences are available and those genes have been used in phylogenetic studies (Fernandez et al., 1998a; 1998b). In a recent phylogenetic study using the 18S rDNA gene and ND₃ mtDNA, the genus *Synthesium*, represented by *S. pontoporiae* and *S. tursionis*, was positioned among

the brachycladids (Marigo et al., in press) but no molecular intraspecific studies have been performed yet.

We analyzed sequences of ITS, COI and ND3 of *S. pontoporiae* from different geographic areas prospecting for intraspecific variation that could indicate stock differentiation of their hosts. *Synthesium pontoporiae* Raga, Aznar, Balbuena and Dailey, 1994 is a small intestinal trematode parasite exclusive of *P. blainvillei* that has been suggested as biological marker for the species and shows differences in prevalence and mean intensity along its distribution (Marigo et al., 2002). However, in a previous taxonomical study, 75 *S. pontoporiae* showed no differences in morphometric data or specific characters among six geographic areas (Marigo et al., 2008). In this study we present the first ITS and COI sequences of the genus *Synthesium*.

Materials and methods

S. pontoporiae were collected from the intestines of *Pontoporia blainvillei* stranded or bycaught in the Southeastern and Southern Brazilian and Argentinian coasts (Figure 1). Intestines were frozen after necropsy and thawed for parasite inspection. The trematodes found were fixed and conserved in 70% ethanol for days and up to 10 years. Each parasite used was collected from a different individual host and named after host number and location (N = 131). Seven areas were sampled: São Paulo State North (SPN); São Paulo State Central (SPC); São Paulo State South (SPS); Paraná State (PR); Santa Catarina State (SC); Rio Grande do Sul State (RS) and Argentina (ARG).

DNA was extracted following the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN®) protocol. Fragments of the ITS region were amplified by PCR using 2 sets of primers, for ITS1) F 5'-GACGACCAAACCTTGATCATT-3' and R 5'-TGCGCTCTTCATCGACACACGA-3' (Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos) and for ITS2) NC13F 5'-ATCGTGAAGAACGCAGC-3' and NC2R 5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT -3' (Zhu et al, 2000).

The ND3 gene was amplified by PCR using 2 sets of primers: a) ND3A 5'-GCGTTAGCAGGATCCTGTGATATAG-3' and ND3B 5'-CCAAAGCTTAAATCATCGTTAGCAG-3' and b) ND3C 5'-CTACTAGTGAGATTGATCTYCGTCGGT-3' and ND3D 5'-CTACTAGTCCCCTCAACRТАACCYT-3' (Fernandez et al, 1998b). Both fragments included one tRNA sequence prior to the ND3 gene sequence. Analysis was performed using only the ND3 gene sequence.

The COI gene was amplified by PCR using primers COIPRA 5'-TGGTTTTTGTGCATCCTGAGGTTTA-3' and 5'-AGAAGAACGTAATGAAAATGAGCAAC-3' (Bessho et al., 1992).

Amplification reactions contained 400ng of DNA, 0,2 mM of dNTPs, 200.0 ng of each primer, 3.0mM of MgCl₂ and 2U of Taq DNA polymerase, in a final volume of 50µl. PCR conditions were: initial denaturation at 94°C for 5min, followed by 40 cycles at 94°C for 30sec, 47°C for 30sec; 72°C for 30sec.

PCR amplicons were purified directly using Perfect Cleanup (Eppendorf). DNA sequencing was performed in ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) from both strands using the PCR primers. Raw sequences were transferred to DNASTAR

software (Lasergene) where consensus sequences were determined. The sequences were aligned on CLUSTAL W (Thompson et al., 1994).

Haplotypes were identified and the genetic diversity within populations was estimated using the software package DnaSP (Rozas et al., 2003).

COI and ND3 sequences were concatenated for population analyses. The program Arlequin 4.5 (Excoffier et al., 2005) was used in analyses of genetic differentiation. Pairwise fixation indices (F_{ST}) were estimated and their significance was ascertained by 10,000 random permutations. The distribution of variation within and between populations was inferred using an analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier et al., 1992). A Spatial AMOVA (SAMOVA, Dupanloup et al. 2002) was also used to search groupings of geographically adjacent localities that had the highest amount of variation among them. Demographic and spatial expansions were investigated using mismatch distribution analyses (Rogers and Harpending 1992) and tests of selective neutrality were performed using Tajima's (1989) and Fu's (1997) test statistics.

The evolutionary rate of the COI for *Schistosoma* (2.5%/My; Atwood et al. 2008) and the generation time of *Schistosoma haematobium* (6 to 12 months; King et al. 2000) were used to estimate the timing of the expansion (t), using the formula $\tau = 2ut$ (Rogers and Harpending 1992). Rough estimates of population sizes (N) before and after the expansion were estimated from θ values, as $\theta = 2uN$. The putative timing of the divergence between *S. pontoporiae* and *S. tursionis* was calculated using a COI molecular clock calibrated with the evolutionary rate of *Schistosoma*, and *S. pontoporiae* and *S. tursionis* COI sequences p-distance (unpublished data).

A Nested Clade Analysis (NCA; Templeton, 1998) was also carried out. Statistical parsimony networks for each mitochondrial gene and the concatenated sequence were built using TCS 1.21 (Clement et al., 2000). Ambiguities in the network of concatenated COI and ND3 haplotypes were solved according to the criteria of Crandall and Templeton (1993). The new nucleotide sequences reported in this paper for *S. pontoporiae* are available in GenBank (Accession numbers will be available by the time of the submission of the article).

Results

Thirty one sequences of the ITS1 (534bp) and 29 sequences of the ITS2 (447bp) of *S. pontoporiae* were analyzed. The ITS1 sequences obtained were identical within the seven different locations. The same was observed in the ITS2 sequences, so they were not used for population analyses.

A total of 37 sequences of the mtDNA ND3 of *S. pontoporiae*, spanning 331bp, were analyzed, revealing 10 haplotypes defined by 13 variable sites. The G+C content was 0,351. Haplotype (gene) diversity (H_d) was 0,577 and nucleotide diversity (per site, P_i) was 0,00291.

Thirty four sequences, covering 416 bp of the COI, were also analyzed, revealing 24 haplotypes and 30 variable sites. The G+C content was 0,381. Haplotype (gene) diversity (H_d) was 0,932 and nucleotide diversity (per site, P_i) was 0,00717 (Table 1).

Table 1: Number of *S. pontoporiae* sequences by location sampled and DNA region amplified.

Location	ITS1	ITS2	ND3	COI	COI+ND3
SPN	6	6	6	6	6
SPC	7	7	8	6	6
SPS	3	4	6	6	5
PR	2	1	2	2	1
SC	7	6	6	6	4
RS	3	3	3	3	3
ARG	3	2	6	5	5
Total	31	29	37	34	30

For population analyses, the ND3 and COI sequences of 30 parasites were concatenated. The single sequence from PR was joined with sequences from SPS (N = 5), since these localities are less than 77 Km away. The highly divergent sequence BP06SPC was excluded during population differentiation analysis.

Table 2 shows the values of pairwise fixation indices (F_{ST}). All results were non-significant for the six sites.

Table 2: Pairwise genetic differentiation (F_{ST}) among sampling sites of *S. pontoporiae*.

	SPN	SPC	SPS+PR	SC	RS	ARG
SPC	-0,062	-				
SPS+PR	-0,057	-0,028	-			
SC	-0,040	0,019	-0,084	-		
RS	-0,067	-0,029	-0,051	-0,125	-	
ARG	0,041	-0,018	-0,027	-0,020	-0,004	-

Population differentiation scenarios based on the stocks previously proposed for franciscana dolphins were tested using AMOVA. Table 3 presents the groupings tested,

together with the corresponding Φ_{CT} and P values. No significant separation of the populations was supported by AMOVA, suggesting absence of geographic structuring. Other hypothetical population divisions were also evaluated, but none of them was significant. SAMOVA also failed to detect any significant grouping of geographically adjacent sampling localities.

Table 3: Analysis of genetic population subdivision (Φ_{CT}) through AMOVA, using COI+ND3 concatenated sequence data, for each population differentiation scenario.

Number of populations	Φ_{CT}	P
2 populations		
(SPN+SPC+SPSPR+SC)x(RS+ARG)	0,004	0,39
(SPN+SPC+SPSPR)x(SC+RS+ARG)	0,02	0,10
(SPN+SPC+SPSPR+SC+RS)x(ARG)	0,0006	0,48
3 populations		
(SPN+SPC+SPSPR)x(SC)x(RS+ARG)	0,02	0,21
(SPN+SPC+SPSPR)x(SC+RS)x(ARG)	0,02	0,15
(SPN+SPC+SPSPR+SC)x(RS)x(ARG)	0,001	0,48
4 populations		
(SPN+SPC+SPSPR)x(SC)x(RS)x(ARG)	0,02	0,27
(SPN+SPC)x(SPSPR+SC)x(RS)x(ARG)	0,03	0,14
(SPN)x(SPC)x(SPSPR+SC)x(RS+ARG)	0,02	0,27
5 populations		
(SPN+SPC)x(SPSPR)x(SC)x(RS)x(ARG)	0,03	0,25
(SPN)x(SPC)x(SPSPR)x(SC)x(RS+ARG)	0,006	0,30
(SPN)x(SPC)x(SPSPR+SC)x(RS)x(ARG)	0,026	0,30
(SPN)x(SPC)x(SPSPR)x(SC+RS)x(ARG)	0,02	0,34

The haplotype networks of both markers also suggest lack of population structure, since samples from all localities are scattered throughout the networks (Figure 1). Indeed, the NCA failed to detect significant associations between genetic variability and geographic distribution. Another pattern observed in both haplotype networks is a star-like conformation, usually attributed to population expansion.

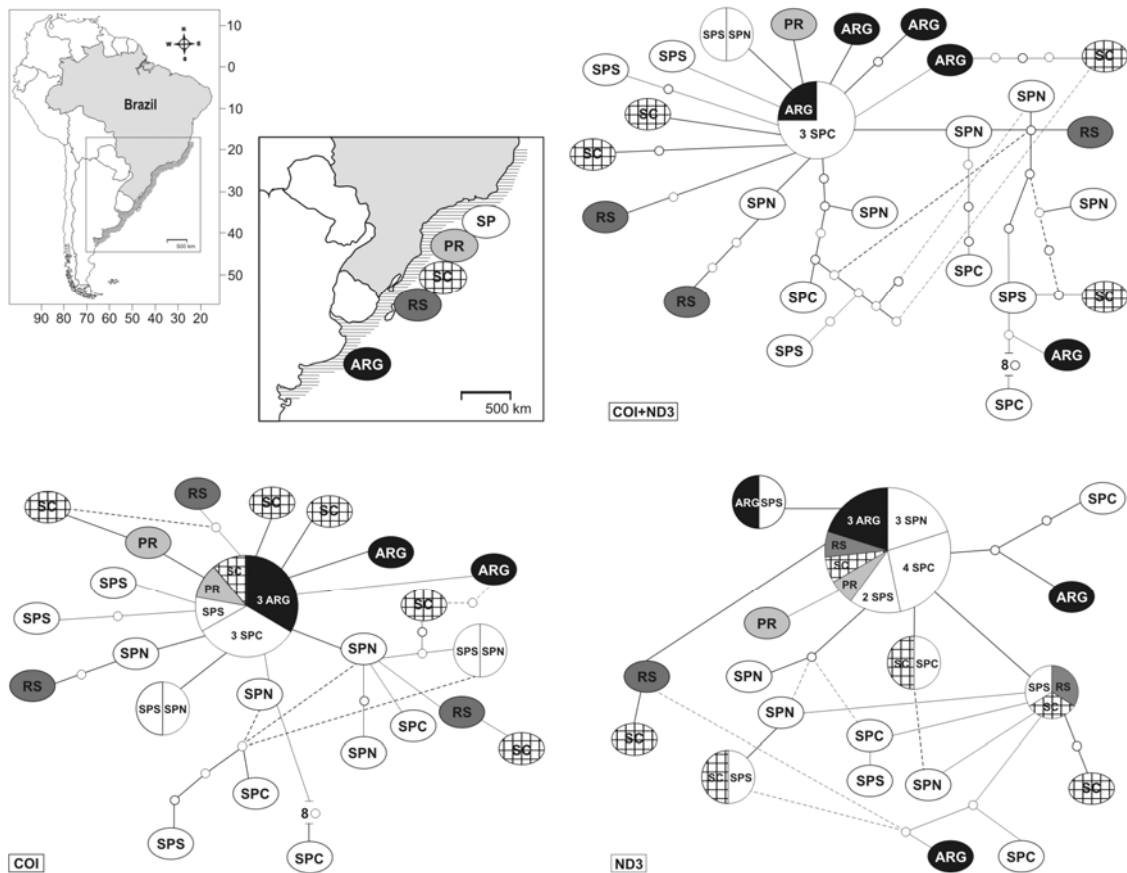


Figure 1: Sampling locations and mitochondrial DNA genealogies (statistical parsimony networks). Each connection is a single mutational step with blank small circles representing inferred haplotypes. Observed haplotypes are shown as circles containing sampling locations and sizes of circles are proportional to the number of individuals with that haplotype. Frequency of haplotypes is shown as proportional pie diagrams. Reticulations in the networks represent all most-parsimonious connections. Solid lines show relations that were maintained for NCA. Sampling locations are SP= São Paulo North, Central and South; PR= Paraná; SC= Santa Catarina; RS= Rio Grande do Sul; ARG= Argentina.

The hypotheses of demographic and spatial expansion were not refuted by mismatch distribution analyses, which were consistent with both types of expansion. *S. pontoporiae* as a whole exhibited negative and significant D and F_s values, also consistent with expansion events. Besides this expansion of the entire species, SC, RS and ARG showed a unimodal distribution supporting a model of expansion. However, among locations, ARG was the only one showing evidence of expansion in at least three tests (Mismatch, D and F_s values) (Table 4; Figure 2). Using τ values of the mismatch analyses, expansions of *S. pontoporiae* were estimated between 134,856 (54,087 – 188,462) and 67,428 (27,043 – 94,231) years ago (for generation times of 12 and 6 months, respectively). Population size

would have expanded from 1,587 (0 – 44,856) to 2,422,596 (419,135 – infinite) individuals. The putative timing of the divergence between *S. pontoporiae* and *S. tursionis* dated at 1,8 Million years.

Table 4: Mismatch and neutrality tests by sampling sites and the entire *S. pontoporiae* species, using the concatenated COI+ND3 sequence).

	Mismatch		Tajima's D	Fu's Fs
	Demographic	Spatial		
SPN	SSD 0,16 P = 0,04	SSD = 0,16 P = 0,04	-0,68 P = 0,32	-2,29 P = 0,04
SPC	SSD 0,34 P = 0,02	SSD = 0,34 P = 0,02	-0,85 P = 0,28	1,78 P = 0,81
SPS+PR	SSD = 0,17 P = 0,03	SSD = 0,17 P = 0,03	-0,99 P = 0,21	-2,27 P = 0,04
SC	SSD = 0,06 P = 0,70	SSD = 0,06 P = 0,70	-0,28 P = 0,53	-0,32 P = 0,22
RS	SSD = 0,12 P = 0,53	SSD = 0,12 P = 0,53	0 P = 0,75	0,58 P = 0,41
ARG	SSD = 0,01 P = 0,93	SSD = 0,01 P = 0,93	-1,16 P = 0,07	-2,37 P = 0,02
<i>S. pontoporiae</i>	SSD = 0,007 P = 0,37	SSD = 0,007 P = 0,37	-1,79 P = 0,02	-23,12 P = 0

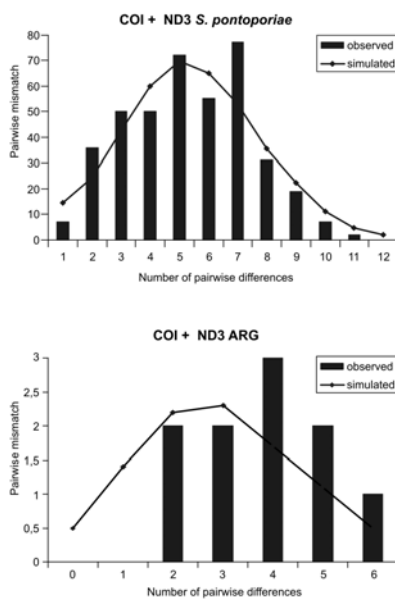


Figure 2: Pairwise mismatch distributions of the entire *S. pontoporiae* species and for the Argentinian samples (ARG)

Discussion

Molecular studies of digenean trematodes with indirect life cycle are more often motivated by the need to understand the epidemiology of parasites of medical and economical importance such as *Schistosoma* (Shrivastava et al., 2005) and almost nothing is known about the genetic structure of endoparasitic helminths in marine habitats (Vilas et al., 2003). In this study we seek different ecological stocks among *Synthesium pontoporiae* aiming to help understanding the genetic structure of its host, the endangered dolphin *Pontoporia blainvillei*.

Variation observed in infection levels of *S. pontoporiae* along its host distribution (Marigo et al, 2002, Secchi et al 2002) and the absence in animals from Rio de Janeiro (Santos et al., 1996) corroborates with the hypothesis of different *P. blainvillei* stocks (Pinedo, 1991, Secchi et al. 1998, Mendez et al, 2007) and the putative stock subdivision proposed by Secchi et al. (2003). There is a linear tendency of increase of mean infection levels in *S. pontoporiae* according to the geographic distance as latitudes increase (Marigo et al., 2002). Even though there were significant differences in the infection levels, no significant differences were observed in the morphology and morphometry of *S. pontoporiae* (Marigo et al, 2008).

Based on this information we searched for possible genetic differences among those parasites considering the hypothesis of a genetic structure in accordance with the different stocks of *P. blainvillei*.

ITS data have been successfully used to discriminate among closely related species of schistosomes, fasciolids and echinostomes (Morgan; Blair, 1995). Luton et al.(1992) reported the first ITS sequences of congeneric species of digeneans of *Dolichosaccus* frogs. They concluded that intraspecific differences at a single locality were few and the most conspicuous difference between the species is in the length of the ITS1 due to the presence of several repeats (Morgan; Blair, 1995; van Herwerden et al., 1999). Still, in our study, *S. pontoporiae* of seven different areas were identical in sequences and size of both ITS1 and ITS2 confirming our previous morphological data of a unique population of *S. pontoporiae* along the Southwestern Atlantic coast (Marigo et al, 2008) and therefore these markers were not used in population analysis.

Studies that performed comparisons of genetic distances from pairs of congeners using both mtDNA and ITS sequences demonstrated that mtDNA sequences of platyhelminths accumulate nucleotide substitutions at a much higher rate than ITS (Vilas et al., 2005). Indeed, the mitochondrial genes ND3 and COI of *S. pontoporiae* presented sequence variation.

Within COI and ND3 sequences, all sampling locations showed low levels of nucleotide diversity but moderate (ND3) or high (COI) haplotypic diversity. This pattern of genetic diversity can be attributed to population expansion. The star-shaped haplotype networks detected in *S. pontoporiae* are also consistent with such an explanation. Mismatch distribution analyses further support both demographic and spatial expansion scenarios, as well as Tajima's and Fu's tests, which are statistically significant for the whole species. Besides the mismatch distribution analyses, F_s was also significant for ARG locality, suggesting population expansion.

A successful parasitism by digenean trematodes may be defined by combinations of specialized dietary habits, adoption of specialized sites within their hosts, restriction to

ecologically related groups of second intermediate and definitive hosts, and restriction to phylogenetically related groups of first intermediate hosts (Cribb et al. 2002). Their life cycle usually involves both free-living and parasitic stages and always incorporates both asexual and sexual multiplication, alternating between mollusks and vertebrate hosts (Cribb et al. 2003). Considering fishes as definitive host it is known that the host diet has a profound effect on the range of their digenean families (Cribb et al. 2002) as similarly occurs in parasite transmission for dolphins where potential prey is also important (Berón-Vera et al. 2007). Jousson et al. (2000) showed that factors associated with host ecology such as food preferences and patterns of habitat use may be the main ones generating specificity in passively transmitted intestinal parasites, like the *Synthesium* studied here. In addition, the likelihood of a successful colonization depends on the probability of encounter and the physiological and immunological compatibility between the parasite and the potential new host (Fernandez et al., 2000).

P. blainvillei is part of the peculiar, endangered and poorly known “river dolphins” group, which are morphologically and phylogenetically distinct from marine dolphins. Although considered a river dolphin, *Pontoporia* during its evolution, followed the marine waters and colonized the nearshore coastal zone north and south of the La Plata estuary (Hamilton et al., 2001). *P. blainvillei* is one of the cetaceans with the largest number of smallest teeth. Those teeth are adapted to hold soft prey such as squid and small juvenile fish. The presence of only two stomachs and the absence of the anterior stomach may also be related to its peculiar diet (Pinedo, 1982). Although there is some overlap in distribution and prey species in relation to other odontocetes, there is a distinction in prey size and in some areas only *P. blainvillei* would be preying on cephalopods and crustaceans.

Host vagility should be a major determinant of parasite gene flow because many parasites have low dispersal capability in their free-living stages. A corollary hypothesis is that gene flow in a parasite with a complex life cycle will be controlled by the most mobile host (Criscione et al., 2005). Although dolphins are considered highly mobile, *P. blainvillei* individuals satellite-tracked in Argentina exhibited localized movements and small home ranges in bay areas (Bordino et al, 2008). Also, genetic studies show significant genetic subdivision at regional levels and fine scale structure with, for example, at least two genetically recognizable populations of franciscana dolphins within Argentina (Mendez et al., 2007). If the parasite cycle were restricted to the host’s range, the parasite population would be also subdivided, due to its short generation time and higher evolutionary rates. However, considering our results, where we found no structure and apparently a single parasite population, it is possible that some prey of *P. blainvillei* involved in the *S. pontoporiae* life cycle are most mobile than the definitive host, carrying parasites across franciscana Management Areas (“FMA”).

The franciscanas present seasonal fluctuations in their diet components that coincide with the abundance pattern of their prey species during the year, indicating that *P. blainvillei* may feed opportunistically on prey that are more frequent in one area. It preys mainly on small Sciaenidae fish, but also on species of squids (*Loligo sanpaulensis*, *Loligo plei* and *Lolliguncula brevis*), and other cephalopods and crustaceans along its distribution. The franciscana’s diet also varies with age, crustaceans being more important to juveniles, for example (Danilewicz et al., 2002). Among *P. blainvillei* fish prey, sciaenids and other teleost species have demonstrated an absence or a very reduced level of population

structuring (Levy et al., 1998). *Macrodon ancylodon* and *Micropogonias furnieri*, for instance, are both structured in two stocks that cross FMA limits in the study area (Lima, 2005; Santos et al., 2006).

Oliveira (2003) found that franciscanas studied in São Paulo South and Paraná State (some of the same individuals studied here) consume a large number of Sciaenidae species but consume more squids in winter, probably due to their abundance in that period. The author also suggests that the adult females consume of squids, rich in water and of easy digestion, may be related to milk production since the birth season is from October to January in those areas.

The *Loligo* species consumed by franciscanas in Brazil, *L. sanpaulensis* and *L. plei*, are species with short life cycles, present all year around with increases in reproductive activity in some seasons. Both move to the continental shelf during spring and summer. The influence of South Atlantic Central Water (SACW) is frequently detected in the continental shelf at the end of spring and summer, which causes changes in the water column temperature due to an influx of colder and less saline waters. Due to the coastal upwelling of this nutrient-rich water mass, the primary productivity is higher, and this is reflected in higher trophic levels (Rodrigues and Gasalla, 2008). Pedraza (2008), studying the relationship between parasites and preys of Argentinian dolphins, suggests that trematodes life cycles directly involve squids and that *Synthesium* life cycles in particular are closely related to the squid *Loligo gahi*. Unfortunately, there is no information to date on the genetic structure of squid populations along the studied area (except for *Loligo gahi*, that is not part of *P. blainvillei* diet), and therefore it is not possible to know if they could be responsible for *S. pontoporiae* gene flow across franciscana Management Areas.

The *Synthesium* life cycle is unknown. For marine mammal's digeneans in general larval forms and metacercariae are poorly recorded. The basic digenean life history involves three generations: two asexual in a mollusc and one sexual in a vertebrate, and in most cases there are one or more intermediary hosts needed to complete the life cycle (Gibson, 2002). The franciscana diet includes cephalopods, crustaceans and fish, and many of those are species that spend most of their adult lives offshore and migrate to estuarine and protected areas to spawn (Rodrigues and Gasalla, 2008; Sardina and Lopez Cazorla, 2005). Any of those animals may be part of the cycle although no brachycladid metacercaria has been found in them yet. In coastal areas, the *S. pontoporiae* adults present in franciscanas shed their eggs and the cycle is completed in the presence of these molluscs and fishes.

The river dolphins' ancestors were probably inhabitants of Miocene epicontinental seas that survived in river systems, while their marine relatives were superseded by the radiation of Delphinoidea. The Amazon and Parana river basins in South America were penetrated deeply by marine waters during Miocene high sea-levels stands. The shallow estuarine regions created by the mixing of riverine and marine waters probably supported diverse food resources, particularly for aquatic animals able to tolerate osmotic differences between fresh and salt water systems. Draining of the epicontinental seas occurred with a Late Miocene sea-level regression, which continued throughout the Pliocene. During the highest global level, the Amazon and Paraná may have been connected, forming an interior sea that divided the continent, termed the Paranaense sea. The hypothesis is that the dolphins entered the Paranaense sea from the north, diversified within its complex fluvial-

estuarine-marine system and colonized as far as the south-west Atlantic Ocean. Lowering of the global sea-level drained the inland sea separating the northern and southern river basins, and isolating the taxa. *Pontoporia* followed the marine waters, the recede of the Paraná basin, to colonize the coastal zone north and south of the La Plata estuary (Hamilton et al., 2001).

Gibson (2002) comments that marine mammal's relatively recent derivation, in evolutionary terms, from terrestrial forms is one explanation for their limited trematode fauna. The most likely alternative for the origin of marine mammals' parasites is through the acquisition of a marine digenean fauna already established in marine molluscs, by terminal addition or host switching. In fact, the hypothesis for the origin of Brachycladiidae places it in the Acanthocolpidae family of parasites of fish by terminal addition. The hypothesis is that the trematodes whose cycle ended in fishes were able to switch to mammalian hosts (Fernandez et al., 1998a; Olson et al., 2003; Bray et al., 2005; Marigo et al., 2008).

Within the Brachycladiidae, *Synthesium* is the genus that exhibits a worldwide distribution and occurs in a number of odontocete families (Pontoporiidae, Delphinidae, Monodontidae and Phocoenidae). These features suggest a long period of host-parasite interactions, with many potential hosts captures among different odontocete groups (Fernandez et al., 1998b). However, it is not possible yet to determine when and which *Synthesium* species adapted first to its odontocete host. However it is possible that the ancestral of the *Synthesium* species adapted first to other odontocete families and latter to *Pontoporia*. When the morphologically and phylogenetically distinct *Pontoporia* colonized the coastal areas it was in contact with infected intermediary hosts through its diet. The franciscanas' evolutionary and biological peculiarities may be responsible for *S. pontoporiae* exclusivity as a parasite found only in *P. blainvillei*. The putative timing of the divergence between *S. pontoporiae* and *S. tursionis*, dated at 1,8 Million years, corroborates this hypothesis of the latter acquisition and adaptation of *S. pontoporiae* to *P. blainvillei*.

The expansion of the *S. pontoporiae* population happened between 134.856 (54.087 – 188.462) and 67.428 (27.043 – 94.231) years ago and does not coincide with this period of speciation between the two *Synthesium* species neither with the time of the colonization of the South American coast by *Pontoporia*.

It may represent a recent event that has caused the expansion of its definitive host or any of the other intermediary hosts. The expansion occurred in the period where at least 16 glaciations occurred followed by defrost (Salgado-Labouriau, 1996). Authors mention a pattern related to this period were several marine species followed a expansion model prior to the last glacial maximum (Chevolot et al., 2006; Derycke et al., 2008).

Our data confirms the hypothesis of Criscione et al. (2005) that the most mobile host controls the gene flow in a parasite with a complex life cycle. Due to the vagility of the intermediary hosts, *Synthesium pontoporiae* does not present sufficient isolation to determine a population structure in accordance with their host's stocks, *Pontoporia blainvillei*.

Acknowledgments

This work is part of the PhD Dissertation of J. Marigo that acknowledges the IOC grant. We thank Koko Otsuki and Fernanda Freitas for their technical assistance. Also Heloisa M. Diniz (Laboratório de Produção e Tratamento de Imagem-IOC) for graphic assistance and PDTIS/FIOCRUZ genomic platform for DNA sequencing.

Cetacean Society International, the Society for Marine Mammalogy, Yaqu Pacha, Project AWARE- PADI, Fundação O Boticário de Proteção à Natureza and PROBIO/FNMA for financial support.

We also thank those who provided intestines for parasite sampling: Projeto BioPesca, SP (C.P. Bertozzi, V. Ruoppolo, J.A.Ribeiro, J.V.S. Lima, M.B. Alonso, F. Marcatto and B. Henning); Instituto Terra & Mar, São Paulo (S.P. Souza); Instituto de Pesquisas de Cananéia (IPeC); Centro de Estudos do Mar (CEM-UFPR) (F.C.W. Rosas, M.R. Oliveira); Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) (M.J. Cremer); Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) (A.S. Barreto); Grupo de Estudos de Mamíferos Aquáticos do Rio Grande do Sul (GEMARS-CECLIMAR-UFRGS) (D. Danilewicz, I.B. Moreno); Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" (CONICET) (L.Capozzo).

References

Andrade A, Pinedo MC, Pereira JrJ. The gastrointestinal helminths of Franciscana, *Pontoporia blainvillei*, in Southern Brazil. Report Int Whall Comm.1997; 47:669-73.

Atwood SW, Fatih FA, Upatham ES. DNA-Sequence variation among *Schistosoma mekongi* populations and related taxa; phylogeography and the current distribution of Asian Schistosomiasis. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(3):e200.

Attwood SW, Upatham ES, Meng XH, Qiu DC, Southgate VR. The phylogeography of Asian *Schistosoma* (Trematoda: Schistosomatidae). Parasitology. 2002; 125:99–112.

Beron-Vera B, Crespo EA, Raga JA, Fernandez M. Parasites communities of common dolphins (*Delphinus delphis*) from Paragonia: the relation with host distribution and diet and comparison with sympatric hosts. J Parasitol. 2007;93(5):1056-1060.

Bessho Y, Ohama T, Osawa S. Planarian mitochondria 1. Heterogeneity of cytochrome c oxidase subunit 1 gene sequences in the freshwater planarian, *Dugesia japonica*. J Mol Evol. 1992; 34:324•330.

Bordino P, Siciliano S, Bastida R, Cremer M. Report of the working group on distribution and behaviour. LAJAM. 2002;1(1):21-23

Bray RA, Webster BL, Bartoli P, Littlewood DT. Relationships within the Acanthocolpidae Lühe, 1906 and their place among the Digenea. *Acta Parasitol.* 2005;59(4):281-291.

Chevolot M, Hoarau G, Rijnsdorp AD, Stam, WT, Olsen JL. Phylogeography and population structure of thornback rays (*Raja clavata* L., Rajidae). *Mol Ecol.* 2006;15:3693-3705.

Clement MD, Posada D, Crandall KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol.* 2000; 7: 381–397.

Crandall KA, Templeton AR. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics.* 1993;134(3): 959-969.

Cribb TH, Chisholm LA, Bray RA. Diversity in the Monogenea and Digenea: does lifestyle matter? *Int. J. Parasitol.* 2002;32:321-328.

Criscione CD, Blouin MS. 2004. Life cycles shape parasite evolution: comparative population genetics of salmon trematode. *Evolution.* 2004;58:198–202.

Criscione CD, Blouin MS. Parasite phylogeographical congruence with salmon host evolutionarily significant units: implications for salmon conservation. *Mol Ecol.* 2007. 16:993–1005

Criscione CD, Poulin R, Blouin MS. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol Ecol.* 2005;14:2247–2257.

Derycke S, Remerie T, Backeljau T, Vierstraete A, Vanfleteren J, Vincx M, Moens T. Phylogeography of the *Rhabditis (Pellioiditis) marina* species complex: evidence for long-distance dispersal, and for range expansions and restricted gene flow in the northeast Atlantic. *Mol Ecol.* 2008;17:3306-3322.

Dupanloup SS, Excoffier L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol Ecol.* 2002;11:2571–2581.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolut Bioinform Online.* 2005; 1:47-50.

Excoffier L, Smouse P, Quattro J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992;131:479-491

Fernández M, Aznar FJ, Raga JA, Latorre A. The origin of *Lecithodesmus* (Digenea: Campulidae) based on ND3 gene comparison. *J Parasitol*. 2000;86(4):850-2.

Fernandez M, Aznar FJ, Latorre A, Raga JA. Molecular phylogeny of the families Campulidae and Nasitremitidae (Trematoda) based on mtDNA sequence comparison. *Int J Parasitol*. 1998a; 28:767-775.

Fernández M, Littlewood DTJ, Latorre A, Raga JA, Rollinson D. Phylogenetic relationships of the family Campulidae (Trematoda) based on 18S rRNA sequences. *Parasitology*. 1998b;117: 383-391.

Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 1997;147: 915–925.

Gibson DI. Trematodes in marine mammals: morphology, systematics and origins. *The Tenth International Congress of Parasitology*. Monduzzi Editore (eds.). Vancouver, Canada. 2002. 59-63

Hamilton H, Caballero S, Collins AG, Brownell Jr RL. 2001. Evolution of river dolphins. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;268:549-556.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis – IBAMA. 1997. Mamíferos aquáticos do Brasil. Plano de ação. Brasília: MMA/IBAMA. 80 p.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis – IBAMA. 2001. *Mamíferos Aquáticos do Brasil. Plano de ação*. Brasília: MMA/IBAMA. 96p.

Iwagami M, Monroy C, Rosas MA, Pinto MR, Guevara AG, Vieira JC et al. A molecular phylogeographic study based on DNA sequences from individual metacercariae of *Paragonimus mexicanus* from Guatemala and Ecuador. *J. Helminthol*. 2003; 77, 33–38.

Jousson O, Bartoli P, Pawlowski J. Cryptic speciation among intestinal parasites (Trematoda: Digenea) infecting sympatric host fishes (Sparidae). *J Evol Biol*. 2000;13:778-785.

King CH, Muchiri EM, Ouma JH. Evidence against rapid emergence of praziquantel resistance in *Schistosoma haematobium*, Kenya. *Emerg Infect Dis.* 200; 6(6):585-94.

Levy JA, Maggioni R, Conceição MB. 1998. Close genetic similarity among populations of the white croaker (*Micropogonias furnieri*) in the south and south-eastern Brazilian coast. I. Allozyme studies. *Fish Res.* 1998; 39:87-94.

Luton K, Walker D, Blair D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Mol Bioch Parasitol.* 1992;56:323-328.

MacKenzie K, Campbell N, Mattiucci S, Ramos P, Pinto AL, Abaunza P. 2008. Parasites as biological tags for stock identification of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus*. *Fish Res.* 2008;89:136–145.

Marigo J, Vicente ACP, Valente ALS, Measures L, Santos CP. Redescription of *Synthesium pontoporiae* n. comb. with notes on *S. tursionis* and *S. seymouri* n. comb. (Digenea: Brachycladiidae Odhner, 10905). *J Parasitol.* 2008;94(2):505-514.

Marigo J, Rosas FCW, Andrade ALV, Oliveira MR, Dias RA, Catão-Dias JL. Parasites of *Pontoporia blainvillei* from São Paulo and Paraná States, Brazil. *LAJAM.* 2002;1(1):115-122.

Mendez M, Rosenbaum HC, Bordino P. Conservation genetics of the franciscana dolphin in Northern Argentina: population structure, by-catch impacts, and management implications. *Conserv Genet.* 2007; 9(2):419-435.

Morgan JA, Blair D. Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group. *Parasitology.* 1995;111(Pt 5):609-15.

Morgan JAT, Dejong RJ, Adeoye GO, Ansa EDO, Barbosa CS, Bremond P. et al. Origin and diversification of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Mol Ecol* 2005;14: 3889–3902.

Nolan MJ, Cribb TH. The use and implications of ribosomal DNA sequencing and discrimination of Digenean species. *Adv Parasitol.* 2005;60:101-163.

Oliveria MR. Ecologia alimentar de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: delphinidae) no litoral sul do Estado de São Paulo e Paraná. [Dissertação Mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, UFPR. 2003.

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

Ott PH. Diversidade genética e estrutura populacional de duas espécies de cetáceos do Atlântico Sul Ocidental: *Pontoporia blainvillei* e *Eubalaena australis*. [Tese Doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2002.

Ott PH, Secchi ER, Moreno IB, Danilewicz D, Crespo EA, Bordino, P.; et al. Report of the working group on fishery interactions. *LAJAM.* 2002;1(1):55-64.

Pedraza, S.2008. Ecología poblacional de la tonina overa *Cephalorhynchus commersonii* (Lacépède, 1804) en el litoral patagónico. [Tese Doutorado Biología]. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires. FCEN-UBA. 2008.

Pinedo MC. Development and variation of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*). [Tese Doutorado]. Santa Cruz: University of California. 1991.

Pinedo MC. Análises dos conteúdos estomacais de *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny, 1844) e *Tursiops gephyreus* (Lahille, 1908) (Cetacea, Platanistidae e Delfinidae) na zona estuarial e costeira do Rio Grande, RS, Brasil. [Dissertação Mestrado]. Rio Grande: Fundação Universidade do Rio Grande. 1982.

Pongratz N, Storhas M, Carranza S, Michiels NK. Phylogeography of competing sexual and parthenogenetic forms of a freshwater flatworm: patterns and explanations. *BMC Evol Biol.* 2003; 3:23.

Posada D, Crandall KA, Templeton AR. GeoDis: A program for the Cladistic Nested Analysis of the Geographical Distribution of Genetic Haplotypes. *Mol Ecol.* 2000;9(4):487-488.

Reeves RR, Leatherwood S. (eds). Dolphins, porpoises and whales: 1994-1998 Action Plan for the Conservation of Cetaceans, IUCN, Gland, Switzerland, 92pp. 1994.

Rodrigues AR, Gasalla MA. 2008. Spatial and temporal patterns in size and maturation of *Loligo plei* and *Loligo sanpaulensis* (Cephalopoda:Loliginidae) in southeastern Brazilian waters, between 23°S and 27°S. *Scientia Marina* 72(4), December 2008, 631-643. ISSN 0214-8358 doi: 10.3989/scimar.2008.72n4631

Rogers AR, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise differences. *Mol Biol Evol.* 1992; 9:552–559.

Rozas J, Sánchez-Delbarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinform.* 2003;19: 2496-2497.

Salgado-Laboriau ML. *História Ecológica da Terra*. São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda, 1996.

Santos CP, Rohde K, Ramos R, Di Benedetto AP. Helminths of cetaceans on the southeastern coast of Brazil. *J Helminth Soc Wash.*1996; 63(1):149-152.

Sardiña P, Lopez-Cazorla L. Feeding interrelationships and comparative morphology of two young sciaenids co-occurring in South-western Atlantic waters. *Hydrobiologia*, 2005;548:41–49.

Semyenova SK, Morozova EV, Chisanofova GG, Asatrian AM, Movsessian SO, Ryskov AP. RAPD variability and genetic diversity in two populations of liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Acta Parasitol.* 2003;48, 125–130.

Secchi ER, Danilewicz D, Ott PH. Applying the phylogeographic concept to identify franciscana dolphin stocks: implication to meet management objectives. *J Cetac Res Manag.* 2003; 5(1):61-68.

Secchi ER, Danilewicz D, Ott PH, Ramos R, Lazaro M, Marigo J., Wang JY. 2002. Report of the Working Group on Stock Identity. *LAJAM.* 2002;1(1): 47-54.

Secchi ER, Wang JY, Murray BW, Rocha-Campos CC, White BN. Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic locations in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences. *Can J Zool.* 1998;76(9):1622-1627.

Shrivastava J, Gower CM, Balong Jr E, Wang TP. Population genetics of multi-host parasites-the case for molecular epidemiological studies of *Schistosoma japonicum* using larval stages from naturally infected hosts. *Parasitology.* 2005;131: 617-626.

Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989;123:585-595.

Templeton AR. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypothesis about gene flow and population history. *Mol Ecol*. 1998; 7:381-397.

Theron A, Sire C, Rognon A, Prugnolle F, Durand P. Molecular ecology of *Schistosoma mansoni* transmission inferred from the genetic composition of larval and adult infrapopulations within intermediate and definitive hosts. *Parasitology*. 2004;129: 571–585.

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

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

Vilas R, Criscione CD, Blouin MS. A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology*. 2005; 131:839-846.

Vilas R, Paniagua E, Sanmartin ML. Genetic variation within and among infrapopulations of the marine digenetic trematode *Lecithochirium fusiforme*. *Parasitology*. 2003;126: 465–472.

Zarowiecki MZ, Huyse T, Littlewood DTJ. Making the most of the mitochondrial genomes- Markers for phylogeny, molecular ecology and barcodes in *Schistosoma* (Platyhelminthes: Digenea). *Int J Parasitol*. 2007;37:1401-1418.

Wickstrom LM, Haukisalmi V, Varis S, Hantula J, Fedorov VB, Henttonen H. Phylogeography of the circumpolar *Paranoplocephala arctica* species complex (Cestoda: Anoplocephalidae) parasitizing collared lemmings (*Dicrostonyx* spp.). *Mol Ecol*. 2003; 12: 3359–3371.

Wright S. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 1965. 19:395-420.

Discussão

Os estudos taxonômicos realizados em espécimes de Brachycladiidae parasitos de mamíferos marinhos resultaram na redescritção de três espécies com a proposição de novas combinações no gênero *Synthesium*: *Synthesium pontoporiae* n.comb., *Synthesium tursionis* n. comb. e *Synthesium seymouri* n.comb. (Artigo 1).

O parasito intestinal *S. pontoporiae* n. comb. parasita exclusivamente *P. blainvillei* e foi proposto como possível marcador biológico para identificação de estoques de seu hospedeiro (AZNAR *et al.*, 1995; ANDRADE *et al.*, 1997; SECCHI *et al.*, 2002).

Ao investigar o real valor deste trematódeo como indicador biológico, analisamos amostras colhidas em diferentes áreas ao longo da costa sudeste e sul do Brasil e Argentina. Observamos que a descrição original de *S. pontoporiae* estava incompleta e que não estava bem diferenciada das espécies afins do gênero, como indicado na descrição original; i.e., como *Hadwenius pontoporiae*. Além disso, Raga *et al.* (1994) não diferenciaram *S. pontoporiae* de *S. tursionis* n. comb., a espécie mais próxima. Sendo assim, foi necessário redescrever *S. pontoporiae* com base nos parátipos requisitados ao U.S. National Parasite Collection (USNPC 82916) e novos espécimes. *S. tursionis* coletados de *Tursiops truncatus* em águas brasileiras e *Synthesium seymouri* n. comb. coletado de *Delphinapterus leucas* da costa do Canadá também foram comparativamente estudados (Artigo 1).

Todos os espécimes de *S. pontoporiae* estudados eram adultos com ovos e as medidas foram similares as dos espécimes estudados por Raga *et al.* (1994). Variações morfométricas e a perda de espinhos do tegumento e cirro são, muito provavelmente, devido ao fato de que os parasitos foram recuperados de hospedeiros que estavam mortos e congelados. Tais tipos de alterações já foram reportados por outros autores (ADAMS e RAUSCH, 1989; GIBSON, 2005). No entanto, a presença de discos basais no tegumento e cirro foi observada indicando que estes órgãos anteriormente continham espinhos.

Os espécimes analisados, obtidos de seis distintas localidades, apresentaram um mesmo padrão morfométrico, tanto dentro quanto entre as localidades amostradas. Não foi possível observar diferenças morfológicas que indicassem possíveis estoques de *S. pontoporiae* ao longo da costa sudeste e sul do continente sulamericano (Artigo 1).

Uma característica diagnóstica importante de *S. pontoporiae* é a razão entre as ventosas, que apresentou um padrão de 1:1.5 –3.0 em todos os 95 espécimes das seis áreas amostradas. A razão entre as ventosas de *S. tursionis* foi de 1:0.8 –1.2 e de *S. seymouri* 1:0.5-0,7, este último difere ainda de *S. pontoporiae* por ter a ventosa ventral até três vezes mais larga que a ventosa oral.

A ventosa oral de *S. pontoporiae*, *S. tursionis* e *S. seymouri* é subterminal. No entanto, o formato arredondado da faringe de *S. seymouri* difere bastante do formato piriforme da faringe de *S. tursionis* e *S. pontoporiae*. Em *S. tursionis* as duas partes da faringe tem comprimento igual, enquanto que em *S. pontoporiae* a porção anterior é menor que a posterior. Gibson (2005) afirma que em *Synthesium*, “a prefaringe pode envelopar a porção anterior da faringe”. Em alguns espécimes de *S. pontoporiae*, foi possível observar este tipo de ocorrência mas a interpretamos como sendo causada pela contração do corpo.

A bolsa do cirro de *S. pontoporiae* não havia sido descrita anteriormente (RAGA et al.,1994). Nas três espécies a bolsa é alongada-claviforme e estende-se dorsalmente para a ventosa ventral se abrindo via átrio genital. Nossos estudos através da microscopia a laser confocal evidenciaram que a bolsa do cirro de *S. tursionis* e *S. seymouri* são tubulares, diferente da bolsa do cirro de *S. pontoporiae* que tem uma região proximal piriforme bem característica, aparentemente permanente e uma região tubular distal flexível formada por uma evaginação do ducto ejaculatório que se estende até o poro genital (Artigo 1).

Outro caráter diagnóstico avaliado foi a forma e a posição dos testículos. Os testículos de *S. pontoporiae* que foram originalmente descritos como ovais, na verdade variam de oval a lobado (geralmente até cinco lobos). No caso de *S. pontoporiae*, observamos também uma variação na posição dos testículos (anterior/posterior) e na forma (oval, ondulado, lobado), sendo a combinação oval/lobado a mais comum entre os espécimes estudados. A transição da forma do testículo (oval-ondulado-lobado) pode estar relacionada à sua maturação e o testículo posterior provavelmente amadurece antes, já que a combinação oval-oval e lobado-lobado foram raras. No entanto, esta hipótese não está totalmente corroborada por nosso material já que animais maiores ainda apresentavam testículo anterior oval e posterior lobado. Estudos adicionais são necessários para clarificar este padrão.

Os testículos estão situados próximos ao terço posterior do corpo nas três espécies. Esta variação na forma dos testículos também foi observada nos exemplares de *S. tursionis* e já havia sido previamente referida (FERNÁNDEZ *et al.*,1995), mas em *S. seymouri* ambos os testículos são sempre ovais.

Os vitelinos de *S. pontoporiae* e *S. tursionis* são semelhantes e formam pequenos folículos nos campos laterais do corpo. No caso de *S. pontoporiae*, os vitelinos se estendem do nível da vesícula seminal até a extremidade posterior do corpo enquanto em *S. tursionis* os folículos começam sempre após a bolsa do cirro e vão até a extremidade posterior do corpo. Em *S. seymouri* o arranjo dos folículos é bem diferente, em forma de ramos dendríticos radiais nos campos laterais do corpo, distribuídos do nível dos testículos até a extremidade posterior do corpo.

O tamanho dos ovos de *S. pontoporiae* foi similar ao de *S. tursionis* (46-60 x 23-28 vs. 51-55 x 28-32, respectivamente), sendo um dos caracteres mais conservados observados anteriormente em *S. tursionis* (FERNÁNDEZ *et al.*,1995). Os ovos de *S. seymouri* são muitos maiores (83-97 x 51-55) e bem diferenciando das outras duas espécies.

A redescrição de *Synthesium pontoporiae* possibilitou estabelecer um diagnóstico morfológico diferencial de *S. tursionis* e *S. seymouri*, onde as principais características são: razão entre ventosas de 1:1.5-3.0, testículo oval a lobado, cirro com porção proximal piriforme e distal tubular e vitelinos em forma de pequenos folículos dispostos entre a vesícula seminal e a extremidade posterior do corpo. A espécie assim redescrita é considerada como exclusiva de *P. blainvillei* nas águas do Atlântico Sul (Artigo 1).

Com base nas redescrições taxonômicas realizadas em *S. pontoporiae*, *S. tursionis* e *S. seymouri*, o diagnóstico genérico de *Synthesium* foi corrigido para incluir algumas características das ventosas de *S. pontoporiae*, como a seguir: ventosas bem desenvolvidas; ventosa oral menor, similar ou maior que a ventosa ventral; ventosa ventral no primeiro quarto do corpo. Outras espécies do gênero também necessitam ser revisadas para que se tenha uma chave taxonômica completa (Artigo 1).

O estudo da Família Brachycladiidae tem sido limitado pela dificuldade de acesso aos parasitos em seus hospedeiros e uma consequência é a escassez de informação genética disponível. O primeiro estudo que focou as relações genéticas de Digenea foi baseado no

gene 18S RNAr completo (OLSON e TKACH, 2005). Com relação aos brachycladiídeos, somente sequência do gene 18S RNAr de três espécies (*Zalophotrema hepaticum* Stunkard e Alvey, 1929, *Campula oblonga* Cobbold, 1858, *Nasitrema globicephalae* Neiland, Holden e Rue, 1970) e sequência do gene nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase subunidade 3 (ND3, NAD3) DNAm de sete espécies (*Synthesium tursionis*, *Zalophotrema atlanticum* Abril, Balbuena e Raga, 1991, *Campula oblonga*, *Nasitrema globicephalae*, *Orthosplanchnus fraterculus* Odhner, 1905, *Oschmarinella rochebruni* Poirier, 1886, *Lecithodesmus* sp.) já foram obtidas e utilizadas em estudos filogenéticos (FERNÁNDEZ *et al.* 1998a, 1998b; FERNÁNDEZ *et al.*, 2000).

Definimos a sequência do gene 18S RNAr do gênero *Synthesium*, não incluído antes na filogenia do grupo. As sequências de *S. pontoporiae* e *S. tursionis* apresentaram 100% de similaridade e agruparam com as demais espécies de Brachycladiidae, confirmando a posição do gênero com base morfológica (Artigo 2).

As informações do gene 18S RNAr, permitiram uma clara separação entre Brachycladiidae e Acanthocolpidae, trematódeos parasitos de mamíferos marinhos e parasitos de peixes respectivamente. As duas famílias já foram indicadas como irmãs e provavelmente tem uma origem comum resultante de troca de hospedeiro (BRAY *et al.*, 2005). Estes autores usaram *Z. hepaticum* como único representante de Brachycladiidae e mencionaram que um número maior de amostras seria necessário para uma análise mais robusta. Realmente, utilizando quatro representantes de brachycladídeos pudemos separar claramente as duas famílias em dois agrupamentos distintos. Utilizando como marcador o gene ND3 DNAm e alguns gêneros da Brachycladiidae pudemos definir clusters de organismos em função do sítio de infecção no hospedeiro definitivo, ou seja, o cluster *Synthesium* compreendendo parasitos intestinais e os demais gêneros da Brachycladiidae, definindo o cluster dos extra-intestinais (Artigo 2).

Numa análise dos genes 18S e 28S RNAr de Nematoda da ordem Strongylida, também foi encontrada uma separação de acordo com preferência por sítio de infecção e tipo de hospedeiro. Um cluster foi formado por parasitos que ocorrem exclusivamente em pulmões, sistema circulatório e nervoso de marsupiais e mamíferos placentários enquanto um segundo grupo foi formado por parasitos que ocorrem no trato gastrointestinal e tecidos

perineais de vertebrados ou pulmões de aves. Os autores mencionam uma evolução partindo do trato gastrointestinal para outros órgãos (CHILTON *et al.*,2006).

As variações nas taxas de infecção de *S. pontoporiae* ao longo da distribuição geográfica de seu hospedeiro (MARIGO *et al.*,2002, SECCHI *et al.*,2002) e a ausência dos mesmos em animais do Rio de Janeiro (SANTOS *et al.*,1996) corroboram com a hipótese de diferentes estoques de *P. blainvillei* (PINEDO, 1991, SECCHI *et al.*,1998, MENDEZ *et al.*, 2007) e a subdivisão proposta por Secchi *et al.* (2003). Há uma tendência linear de aumento da intensidade média de infecção de *S. pontoporiae* de acordo com a região geográfica à medida que a latitude aumenta (MARIGO *et al.*,2002). Considerando as diferenças significativas nas taxas de infecção, e a ausência de diferenças morfométricas nos espécimes de *S. pontoporiae* coletados em diferentes áreas (Artigo 1), investigamos a variabilidade genética entre estes parasitos. Desta forma avaliamos nossa hipótese de uma estruturação genética da população de parasitos coerente com os diferentes estoques de *P. blainvillei*, seu hospedeiro definitivo (Artigo 3).

Estudos filogeográficos comparativos entre parasitos e seus hospedeiros ou regiões biogeográficas podem ser úteis em diversos aspectos. Padrões filogeográficos congruentes podem indicar regiões histórica e evolutivamente independentes e sugerir fatores que moldem a história populacional intraespecífica. Quando as espécies estão ameaçadas de extinção (como neste caso), a identificação de unidades evolutivas distintas é relevante para estratégias de manejo. Apesar da utilidade potencial de dados genéticos de parasitos, estudos filogeográficos de parasitos não humanos são escassos (CRISCIONE *et al.*,2005, 2007). Alguns exemplos são os estudos de parasitos de salmões (CRISCIONE e BLOUIN, 2004, CRISCIONE *et al.*,2007) e ectoparasitos de aves marinhas (MCCOY *et al.*,2005).

Este é o primeiro estudo genético intraespecífico de brachycladiídeos. No nosso caso, em especial, além das dificuldades inerentes a coleta de parasitos de mamíferos marinhos (hospedeiros mortos e/ou congelados), trabalhamos com uma espécie parasita de um golfinho ameaçado de extinção. Apesar do grande número de *P. blainvillei* mortos acidentalmente em redes de pesca ao longo de sua distribuição, foi necessário contar com a colaboração de vários pesquisadores que auxiliaram na coleta dos golfinhos e necrópsia para separação dos intestinos congelados para posterior triagem e coleta dos parasitos.

Analisamos inicialmente as regiões intergênicas (ITS1 e ITS2), alvos nucleares normalmente usados em estudos de variabilidade genética e marcadores de populações (VILAS *et al.*,2005). Os 31 exemplares de *S. pontoporiae*, de sete diferentes localidades, apresentaram sequências idênticas entre os ITS1 e entre os ITS2.

Dados de ITS têm sido usados com sucesso para discriminar espécies próximas de schistosomas, fascioloides e echinostomas, incluindo estágios de desenvolvimento (JOUSSON *et al.*,1999; MORGAN e BLAIR, 1995). No geral, entre os Digenea, a variação intraespecífica do ITS é insignificante, mas variações já foram detectadas e a diferença mais notável é o tamanho do ITS devido a repetições (JOUSSON *et al.*,1998, 1999; LUTON *et al.*,1992).

No caso dos trematódeos parasitos de pulmões de mamíferos carnívoros, os autores encontraram variações intraindividuais no ITS de indivíduos das espécies do complexo *Paragonimus westermani* Kerbert, 1878 relacionadas ao número variável de repetições e diferenças nas sequências. Os autores concluíram que o ITS não pode ser usado para diferenciar as espécies deste complexo devido a esta grande variação (VAN HERWERDEN *et al.*,1999). Tais autores mencionaram ainda que estas repetições estão ausentes em alguns gêneros de trematódeos demonstrando que os processos de homogeneização envolvidos na evolução de genes sequencialmente repetidos não estão operando de maneira uniforme entre os gêneros de trematódeos.

Corroborando estas informações, em nosso estudo, as sequências de ITS de *S. pontoporiae* de sete diferentes áreas não apresentaram diferenças ou repetições nas sequências de ITS. Desta forma, nossa próxima etapa foi analisar genes mitocondriais.

Estudos que realizaram comparações entre distâncias genéticas de pares de um mesmo gênero usando sequências de DNAm e ITS demonstraram que sequências de DNAm de platelmintos acumulam substituições de nucleotídeos numa taxa muito mais alta que o ITS (VILAS *et al.*,2005).

Os achados de Vilas *et al.* (2005) para platelmintos estão em concordância com os nossos, já que as regiões ITSs de *Synthesium* são 100% similares enquanto que a análise do gene ND3 DNAm de *S. pontoporiae* (331pb) revelou a presença de 10 haplótipos (37 indivíduos), definidos por 13 sítios polimórficos. A diversidade haplotípica (Hd) foi 0,55 e

a diversidade nucleotídica (per site, Pi) foi 0,00291. Cinco assinaturas distinguem *Synthesium* das outras seis espécies de Brachycladiidae nas sequências do gene ND3 DNAm.

Considerando outro gene, também mitocondrial, COI DNAm (416pb) de *S. pontoporiae* (34 indivíduos), verificamos o dobro da diversidade encontrada no ND3, tendo sido definidos 24 haplótipos e 30 sítios polimórficos. A diversidade haplotípica (Hd) foi 0,932 e a diversidade nucleotídica (per site, Pi) foi 0,00717.

Num estudo similar, ITS1, ITS2, ND1 e COI de formas de *Fasciola* sp. também foi encontrada uma baixa diversidade em relação aos ITS (6-8 nucleotídeos) e uma maior diversidade nos genes mitocondriais (62-68 sítios polimórficos) (ITAGAKI *et al.*, 2005).

Entre as sequências de COI e ND3 DNAm, todas as áreas amostradas exibiram baixa diversidade nucleotídica mas moderada (ND3) ou alta (COI) diversidade haplotípica. Este padrão de diversidade pode ser atribuído a uma expansão populacional. A rede de haplótipos com forma de estrela detectada em *S. pontoporiae* também é consistente com tal explicação. A distribuição das diferenças nucleotídicas pareadas entre indivíduos (“mismatch distribution”) adicionalmente suporta os cenários de expansão tanto demográfica quanto espacial bem como os testes de neutralidade de Tajima (1989) e Fu (1997) que foram estatisticamente significativos para a amostra como um todo. Além da “mismatch distribution”, os F_s (estatística- F de Wright, WRIGHT, 1965) também foram significantes para a localidade ARG, sugerindo expansão populacional (Artigo 3).

Os Digenea são geralmente transmitidos por cercárias ou metacercárias. Além da morfologia, um parasitismo bem sucedido realizado pelos digenéticos, é definido por combinações de hábitos especializados de dieta, adoção de sítios de infecção especializados em seus hospedeiros, restrição a grupos ecologicamente relacionados de hospedeiros intermediários e definitivos, e restrição a grupos de primeiros hospedeiros intermediários filogeneticamente relacionados (CRIBB *et al.* 2002). Considerando peixes como hospedeiros definitivos sabe-se que a dieta do hospedeiro tem efeito profundo nas famílias de digenéticos, alguns são transmitidos por hospedeiros intermediários específicos e estão presentes somente em hospedeiros herbívoros, por exemplo (CRIBB *et al.* 2002). Similarmente, Jousson *et al.* (2000) mostraram que fatores associados a ecologia do

hospedeiro tal como, preferências alimentares e padrões de uso de habitat podem ser os principais fatores que geram a especificidade em parasitos intestinais transmitidos passivamente, como os *Synthesium* deste estudo. Berón-Vera *et al.* (2007) também sugeriram que as potenciais presas são importantes na transmissão de parasitos em golfinhos. Além disso, a possibilidade de uma colonização bem sucedida depende da probabilidade do encontro e da compatibilidade fisiológica e imunológica entre o parasito e o novo hospedeiro em potencial (FERNÁNDEZ *et al.*,2000).

P. blainvillei faz parte de um grupo peculiar, pouco conhecido e ameaçado, conhecido como “golfinhos de rio”, que são morfológica e filogeneticamente distintos dos golfinhos marinhos. Embora considerado um golfinho de rio, *Pontoporia* durante sua evolução, seguiu as águas marinhas para colonizar a zona costeira ao norte e ao sul do Estuário do Rio da Prata (HAMILTON *et al.*,2001). *P. blainvillei* é um dos cetáceos com o maior número de dentes, sendo estes os menores em tamanho dentro do grupo. Estes dentes são adaptados a segurar presas moles como lula e pequenos peixes juvenis. A presença de somente dois estômagos e a ausência do estômago anterior também pode estar relacionada a sua dieta peculiar (PINEDO, 1982). Apesar de existir uma certa sobreposição na distribuição e nas espécies predadas com relação a outros odontocetos, existe uma distinção em tamanho de presa e em algumas áreas somente *P. blainvillei* estaria predando sobre cefalópodes e crustáceos.

A mobilidade deve ser um grande determinante do fluxo gênico de parasitos visto que muitos parasitos tem baixa capacidade de dispersão nos seus estádios de vida livre. Uma hipótese é a de que o fluxo gênico em parasitos com ciclos de vida complexos será controlado pelo hospedeiro mais móvel. Embora golfinhos sejam considerados altamente móveis, indivíduos de *P. blainvillei* rastreados por satélite na Argentina exibiram movimentos restritos em pequenas áreas de vida (BORDINO *et al.*,2008). Além disso, estudos genéticos mostraram uma subdivisão populacional regional e estruturação com, por exemplo, pelo menos duas populações geneticamente reconhecidas de franciscanas dentro da Argentina (MENDEZ *et al.*,2007). Se o ciclo de vida do parasito estivesse restrito à área de vida do hospedeiro, a população do parasito também estaria subdividida, devido ao seu curto tempo de geração. No entanto, considerando nossos resultados, onde não encontramos

uma estruturação, mas aparentemente uma única população de parasitos, é possível que algumas presas de *P. blainvillei* envolvidas no ciclo de vida de *S. pontoporiae* sejam mais móveis que o hospedeiro definitivo carregando os parasitos através das áreas de manejo das franciscanas.

Um estudo de digenéticos parasitos de enguias marinhas demonstrou resultado semelhante ao nosso, onde não foi encontrada estruturação na população. Neste caso, os hospedeiros definitivos também apresentaram mobilidade reduzida e territorialidade e os autores mencionaram que é possível que a mobilidade de diferentes hospedeiros intermediários e paratênicos moldem as diferentes populações que cohabitam dentro do hospedeiro definitivo. Além disso, as populações dos parasitos sofrem grandes flutuações demográficas e a composição genética das infrapopulações pode mudar significativamente ao acaso em cada geração devido a grandes mortalidades ou altas taxas reprodutivas. Apesar das populações de trematódeos (incluindo larvas e adultos) aparentarem grande número de indivíduos, o tamanho efetivo da população deve ser bem menor devido a sua distribuição desigual no ambiente. Além disso, é provável que cada infrapopulação represente uma quantidade de indivíduos geneticamente iguais como resultado de amplificação assexuada (VILAS *et al.*, 2003).

As toninhas apresentam flutuações sazonais nos componentes de sua dieta que coincidem com o padrão de abundância de suas espécies de presas durante o ano, indicando que *P. blainvillei* pode se alimentar oportunisticamente de presas que sejam mais frequentes em uma área. Predam principalmente sobre pequenos peixes Sciaenidae mas também sobre espécies de lulas (*Loligo sanpaulensis* Brackoniecki, 1984, *Loligo plei* Blainville, 1823 e *Lolliguncula brevis* Blainville, 1823) e outros cefalópodes e crustáceos ao longo de sua distribuição. A dieta das toninhas também varia de acordo com a idade, sendo os crustáceos mais importantes para os juvenis, por exemplo (DANILEWICZ *et al.*, 2002). Entre os peixes predados pelas toninhas, os Sciaenidae e outras espécies de teleósteos tem demonstrado uma ausência ou reduzida estruturação populacional (LEVY *et al.*, 1998). *Macrodon ancylodon* (Block, 1801) e *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1822), por exemplo, são ambos estruturados em dois estoques que atravessam os limites das áreas de manejo das toninhas das áreas de estudo (LIMA, 2005; SANTOS *et al.*, 2006).

Oliveira (2003) estudou a dieta de toninhas de São Paulo Sul e Paraná (alguns indivíduos são os mesmos deste estudo) que consomem um grande número de espécies de Sciaenidae, mas consomem mais lulas no inverno. As espécies de *Loligo* consumidas pelas toninhas no Brasil, *L. sanpaulensis* e *L. plei*, tem ciclos de vida curtos e estão presentes durante todo o ano com aumento na ocorrência costeira durante a atividade reprodutiva em determinadas estações. Ambas se movem para a plataforma continental durante a primavera e o verão. A influência das Águas Centrais do Atlântico Sul (ACAS) é frequentemente detectada na plataforma continental no final da primavera e verão, causando mudanças na temperatura da coluna d'água devido a um influxo de águas mais frias e menos salinas. Devido à presença desta massa de água rica em nutrientes ocorre um aumento da produtividade primária que se reflete até os níveis tróficos mais altos (RODRIGUES e GASALLA, 2008).

Pedraza (2008), estudando as relações entre parasitos e presas de golfinhos de Commerson na Argentina, sugeriu que os ciclos de vida de trematódeos envolvam diretamente lulas e que o ciclo de vida de *Synthesium* em particular esteja diretamente relacionado com a espécie de lula *Loligo gahi* D'Orbigny, 1835.

O ciclo de vida no gênero *Synthesium* é desconhecido. Para trematódeos digenéticos de mamíferos marinhos em geral, as formas larvares são pouco reportadas. A história de vida básica de digenéticos envolve gerações assexuadas em um molusco e sexuada em um vertebrado, e, na maioria dos casos existe um hospedeiro intermediário ou mais necessários para completar o ciclo de vida (GIBSON, 2002). A dieta das toninhas inclui cefalópodes, crustáceos e peixes, e muitos destes são espécies que passam a maior parte de suas vidas adultas longe da costa e migram para áreas estuarinas e protegidas para se reproduzir (RODRIGUES e GASALLA, 2008; SARDINA e LOPEZ CAZORLA, 2005). Qualquer um destes animais pode fazer parte do ciclo embora ainda nenhuma metacercária de brachycladiídeo tenha sido encontrada nos mesmos. Em áreas costeiras, os adultos de *S. pontoporiae* presentes nas franciscanas liberam seus ovos e o ciclo é provavelmente completado na presença de moluscos e peixes marinhos.

A distribuição de *P. blainvillei* em águas marinhas costeiras e sua história evolutiva está de certa forma relacionada com a aquisição de *S. pontoporiae*, seu parasita exclusivo.

Os ancestrais dos “golfinhos de rio” foram provavelmente habitantes dos mares epicontinentais do Mioceno que sobreviveram nos rios enquanto seus parentes marinhos sucumbiram com a radiação dos Delphinoidea. As bacias do rio Amazonas e Paraná na América do Sul foram invadidas por águas marinhas durante os aumentos dos níveis do mar no Mioceno. Durante o mais alto nível do mar global, o rio Amazonas e o Paraná estavam conectados, formando um mar interior que dividia o continente, chamado de mar Paranaense (HAMILTON *et al.*,2001). Os golfinhos teriam entrado neste mar pelo norte do continente, diversificado em seu complexo sistema fluvial-estuarino-marinho e colonizado seus limites no Oceano Atlântico Sul Ocidental. A posterior diminuição do nível do mar global no final do Mioceno, que continuou durante o Plioceno drenou este mar interno separando as bacias do norte e sul, isolando os taxa de golfinhos. *Pontoporia* seguiu o recuo das águas marinhas da bacia do Paraná para colonizar a zona costeira ao norte e ao sul do estuário do Rio da Prata (HAMILTON *et al.*,2001).

A alternativa mais provável para a origem dos parasitos dos mamíferos marinhos é a através da aquisição de uma fauna digenética marinha já estabelecida em moluscos marinhos, com adição terminal ou troca de hospedeiro. A origem dos Brachycladiidae está relacionada com a família Acanthocolpidae de parasitos de peixes, através de adição terminal. A hipótese é que os trematódeos cujo ciclo terminava em peixes foram capazes de trocar para hospedeiros mamíferos (FERNÁNDEZ *et al.*,1998a; OLSON *et al.*,2003; BRAY *et al.*,2005) (Artigo 2).

Dentro de Brachycladiidae, *Synthesium* é o gênero que exhibe uma distribuição mundial e ocorre em várias famílias de odontocetos (Pontoporiidae, Delphinidae, Monodontidae e Phocoenidae). Estas características sugerem um longo período de interações hospedeiro-parasito, com potenciais capturas de novos hospedeiros dentro de diferentes grupos de odontocetos (FERNÁNDEZ *et al.*,1998b). No entanto, ainda não é possível determinar quando e qual espécie de *Synthesium* se adaptou primeiro a um hospedeiro odontoceto. É possível que o ancestral das espécies de *Synthesium* tenha se adaptado primeiro a outras famílias de odontocetos e depois à *Pontoporia*. Quando *Pontoporia*, morfológica e filogeneticamente distinta, colonizou as áreas costeiras entrou em contato com hospedeiros intermediários infectados através de sua dieta. As

peculiaridades evolutivas e biológicas das toninhas podem ser responsáveis pela exclusividade de *S. pontoporiae* em *P. blainvillei*. O tempo de divergência putativo entre *S. pontoporiae* e *S. tursionis*, datado a 1,8 milhões de anos, corrobora a hipótese da aquisição tardia e adaptação de *S. pontoporiae* a *P. blainvillei* (Artigo 3)

A expansão da população de *S. pontoporiae* ocorreu entre 134-67 mil anos atrás e não coincide com este período de especiação entre as duas espécies de *Synthesium* nem com a colonização da costa sul americana por *Pontoporia* (Artigo 3).

Este período pode representar um evento recente que causou a expansão populacional do hospedeiro definitivo ou de qualquer dos hospedeiros intermediários. Esta expansão ocorreu num período onde pelo menos 16 glaciações ocorreram seguidas de degelo (SALGADO-LABORIAU, 1996). Autores mencionam um padrão relacionado às glaciações onde várias espécies marinhas seguiram um modelo de expansão que antecedeu a última máxima glaciação (CHEVOLOT *et al.*, 2006; DERYCKE *et al.*, 2008).

Nossos resultados dão suporte à hipótese de Criscione *et al.* (2005) de que o hospedeiro mais móvel controlaria o fluxo gênico de um parasita com um ciclo de vida complexo. Devido a mobilidade dos hospedeiros intermediários, *Synthesium pontoporiae* não apresenta isolamento suficiente para determinar uma estrutura populacional concordante com as populações de seu hospedeiro definitivo, *Pontoporia blainvillei*.

5. Conclusões

- *Synthesium pontoporiae* é caracterizada por: razão entre ventosas de 1:1.5-3.0, testículo oval a lobado, cirro com porção proximal piriforme e distal tubular e vitelinos em forma de pequenos folículos dispostos entre a vesícula seminal e a extremidade posterior do corpo.
- Considerando o gene 18S RNAr, *S. pontoporiae* e *S. tursionis* estão geneticamente relacionados à família Brachycladiidae.
- O gene ND3 DNAmT de *S. pontoporiae* estabelece a relação do gênero com o sítio de infecção, separando brachycladideos intestinais de extra-intestinais.
- As regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 de *S. pontoporiae* não apresentam variabilidade intraespecífica.
- As sequências dos genes mitocondriais ND3 e COI DNAmT de *S. pontoporiae* indicam um cenário de expansão populacional que coincide com o período de glaciações.

6. Referências

Adams AM, Raush RL. A revision of the genus *Orthosplanchnus* Odhner, 1905 with consideration of the genera *Odhmeriella* Skriabin, 1915 and *Hadwenius* Price, 1932 (Digenea: Campulidae). *Can J Zool* 1989;67:1268-1278.

Alonso MB. Ocorrência de Compostos Organoclorados em Golfinhos Costeiros do Litoral de São Paulo, Brasil. São Paulo; 2008. Mestrado [Dissertação em Oceanografia Química e Geológica] - Universidade de São Paulo.

Andrade ALV. Comunidade componente de helmintos gastrointestinais da Franciscana, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae), no Rio Grande do Sul, Brasil, e sua utilização como marcador biológico na identificação de estoques. Rio Grande; 1996. Mestrado [Dissertação em Oceanografia Biológica] - Universidade do Rio Grande.

Andrade A, Pinedo MC, Pereira JrJ. The gastrointestinal helminths of Franciscana, *Pontoporia blainvillei*, in Southern Brazil. *Report Int Whall Comm* 1997;47:669-73.

Aznar FJ, Raga JA, Corcuera J, Monzón F. Helminths as biological tags for franciscana (*Pontoporia blainvillei*) (Cetacea: Pontoporiidae) in Argentinian and Uruguayan waters. *Mammalia* 1995;59(3):427-435.

Aznar FJ, Balbuena JA, Raga JA Helminth communities of *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae) in Argentinian waters. *Can J Zool* 1994;72:1-5.

Balbuena JA, Aznar F J, Fernandez M, Raga JA. Parasites as indicators of social structure and stock identity of marine mammals. **In:** Blix, A.S.; Walloe, L.; Ultang, O. **Whales, seals, fish and man. Developments in marine biology.** Amstredam, Elsevier Science; 1995. p. 133-139.

Beron-Vera B, Crespo EA, Raga JA, Fernandez M. Parasites communities of common dolphins (*Delphinus delphis*) from Paragonia: the relation with host distribution and diet and comparison with sympatric hosts. J Parasitol 2007;93(5):1056-1060.

Bertozzi CP, Zerbini AN. Incidental mortality of franciscana, *Pontoporia blainvillei*, in the artisanal fishery of Praia Grande, São Paulo State, BRAZIL. LAJAM 2002;1(1):153-160.

Bordino P, Wells RS, Stamper M. A satellite tracking of franciscana dolphins *Pontoporia blainvillei* in Argentina: preliminary information on ranging, diving and social patterns. [Resumo apresentado à XII Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur y 7º Congreso SOLAMAC; 2008 out. 13-17; Montevideo] p. 72.

Braincovich PE, Timi JT. Parasites as biological tags for stock discrimination of the Brazilian flathead, *Percophis brasiliensis* in the south-west Atlantic. JFishBiol 2008. ISSN 0022-1112, 73: 557-571. DOI [10.1111/j.1095-8649.2008.01948.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01948.x)

Bray RA, Webster BL, Bartoli P, Littlewood DT. Relationships within the Acanthocolpidae Lühe, 1906 and their place among the Digenea. Acta Parasitol 2005;59(4):281-291.

Brownell Jr. RL. Feeding ecology of the franciscana dolphin *Pontoporia blainvillei*, and associated top trophic vertebrates in Uruguayan waters. Tokio, 1975. [Doutorado] - University of Tokyo.

Chevolot M, Hoarau G, Rijnsdorp AD, Stam, WT, Olsen JL. Phylogeography and population structure of thornback rays (*Raja clavata* L., Rajidae). Mol Ecol 2006;15:3693-3705.

Chilton NB, Huby-Chilton F, Gasser RB, Beveridge I. 2006. The evolutionary origins of nematodes within the order Strongylida are related to predilection sites within hosts. Mol Phyl Evol 2006;40:118–128.

Costa P, Lessa EP, Secchi ER. Estructura de grupos del delfin franciscana, *Pontoporia blainvillei*. [Resumo apresentado à XII Reunión de Trabajo de Eespecialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur y 7º Congresso SOLAMAC; 2008a out. 13-17; Montevideo] p. 81.

Costa P, Lessa EP, Secchi ER. Microestructura poblacional del delfin franciscana, *Pontoporia blainvillei*. [Resumo apresentado à XII Reunión de Trabajo de Eespecialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur y 7º Congresso SOLAMAC; 2008b out. 13-17; Montevideo] p. 264.

Cremer MJ, Simões-Lopes PCAS. The occurrence of *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny, 1844) (Cetacea, Pontoporiidae) in an estuarine area in Southern Brazil. *Rev Bras Zool* 2005; 22(3):717-723.

Cribb TH, Chisholm LA, Bray RA. Diversity in the Monogenea and Digenea: does lifestyle matter? *Int. J. Parasitol* 2002;32:321-328.

Criscione CD, Blouin MS. Life cycles shape parasite evolution: comparative population genetics of salmon trematode. *Evolution* 2004;58:198–202.

Criscione CD, Blouin MS. Parasite phylogeographical congruence with salmon host evolutionarily significant units: implications for salmon conservation. *Mol Ecol* 2007. 16:993–1005.

Criscione CD, Poulin R, Blouin MS. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Mol Ecol* 2005;14:2247–2257.

Dailey M. Parasites as an aid to understanding marine mammal populations. **In:** Geraci JR, St Aubin DJ. **Biology of marine mammals: insights through strandings**. National Technical Information Service (PB-239_890). Springfield; 1979. p. 243-244.

Dailey MD, Brownell Jr. RL. A checklist of marine mammals parasites. **In:** Rigdway SR. **Mammals of the sea, biology and medicine.** Springfield: 1972. p. 528-589

Dailey MD, Vogelbein WK. Parasite fauna of three species of antartic whales with reference to their use as potential stock indicators. *Fish Bull* 1991;89(3):355-365.

Danilewicz D., Rosas F, Bastida R, Marigo J, Muelbert M, Rodriguez D. et al. Report of the Working Group on Biology and Ecology LAJAM 2002;1(1):25-42.

Derycke S, Remerie T, Backeljau T, Vierstraete A, Vanfleteren J, Vincx M, Moens T. Phylogeography of the *Rhabditis (Pellioiditis) marina* species complex: evidence for long-distance dispersal, and for range expansions and restricted gene flow in the northeast Atlantic. *Mol Ecol* 2008;17:3306-3322.

Di Benedetto APM, Ramos RMA, Lima NRW. Fishing activity in northern Rio de Janeiro State (Brazil) and its relation with small cetaceans. *Braz Arch Biol Tech* 1998;41: 296-302.

Dogiel VA, Bychowsky BE. 1939. Parasites of the fishes of the Caspian Sea. *Trudy Kompleksnoi izucheniya Kaspiikogo morya.* 1939. 7:1-150.

Faust EC. Human Helminthology. **In:** A manual for clinicians, sanitarians and medical zoologists. London: Henry Klimpton. 1929. 616p.

Fernández M, Aznar FJ, Latorre A, Raga JA. Molecular phylogeny of the families Campulidae and Nasitremitidae (Trematoda) based on mtDNA sequence comparison. *Int J Parasitol* 1998a; 28:767-775.

Fernández M, Aznar FJ, Raga JA, Latorre A. The origin of *Lecithodesmus* (Digenea: Campulidae) based on ND3 gene comparison. *J Parasitol* 2000;86(4):850-2.

Fernández M, Balbuena JA, Pertusa JF, Raga JA. 1995. Biometric variability of *Hadwenius tursionis* (Marchi, 1873) (Digenea, Campulidae) from the intestine of the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821). *Syst Parasit* 1995; 30:67-76.

Fernández M, Balbuena JA, Raga JA. 1994. *Hadwenius tursionis* (Marchi, 1873) n. comb. (Digenea, Campulidae) from the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) un western Mediterranean. *Syst Parasit* 1994;28:223-228.

Fernández M, Littlewood DTJ, Latorre A, Raga JA, Rollinson D. Phylogenetic relationships of the family Campulidae (Trematoda) based on 18S rRNA sequences. *Parasitology* 1998b;117: 383-391.

Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 1997;147: 915–925.

Gibson DI. Family Brachycladiidae Odhner, 1905. **In:** Jones A, Bray RA, Gibson DI. **Keys to the Trematoda**, Vol. 2. London: CAB International and The Natural History Museum. p. 641-652.

Gibson DI. Trematodes in marine mammals: morphology, systematics and origins. **In: The Tenth International Congress of Parasitology**. Vancouver: Monduzzi Editore; 2002.p. 59-63.

Hamilton H, Caballero S, Collins AG, Brownell Jr RL. Evolution of river dolphins. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2001;268:549-556.

Holmes JC. Helminth communities in marine fishes. **In:** Esch GW, Bush AO, Aho JM. **Parasite communities: patterns and processes**. New York: Chapman and Hall. 1990. p. 101-130.

Hwang UW, Ree HI, Kim W. Evolution of Hypervariable Regions, V4 and V7, of Insect 18S rRNA and Their Phylogenetic Implications. *Zoolog Sci* 2000;17:111-121.

International Commission on Zoological Nomenclature. International Code of Zoological Nomenclature- ICZN, 1999. London, 306p.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis – IBAMA. 1997. Mamíferos aquáticos do Brasil. Plano de ação. Brasília: MMA/IBAMA. 80 p.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis – IBAMA. 2001. *Mamíferos Aquáticos do Brasil. Plano de ação*. Brasília: MMA/IBAMA. 96p.

Itagaki T, Kikawa M, Sakaguchi K, Shimo J, Terasaki K, Shibahara T, Fukuda K. Genetic characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. *Parasitology* 2005;131:679–685.

Jarne P, Therón A. Genetic structure in natural opulations of flukes and snails: a practical approach and review. *Parasitology* 2001;123:S27±S40.

Jousson O, Bartoli P, Pawlowski J. Cryptic speciation among intestinal parasites (Trematoda: Digenea) infecting sympatric host fishes (Sparidae). *J Evol Biol* 2000;13:778-785.

Jousson O, Bartoli P, Pawlowski J. Molecular identification of developmental stages in Opecoelidae (Digenea). *Int J Parasit* 1999;29:1853-1858.

Jousson O, Bartoli P, Zaninetti L, Pawlowski J. 1998. Use of the ITS rDNA for elucidation of some life!cycles of Mesometridae (Trematoda/ Digenea). *Int J Parasitol* 1998; 28:1403-1411.

Kagei N, Tobayama T, Nagasaki Y. On the helminthum of franciscana *Pontoporia blainvillei*. *Sci Rep Whales Res Inst* 1976; 28:161-166.

Levy JA, Maggioni R, Conceição MB. Close genetic similarity among populations of the white croaker (*Micropogonias furnieri*) in the south and south-eastern Brazilian coast. I. Allozyme studies. Fish Res 1998; 39:87-94.

Lima D. **Genética de populações da corvina *Micropogonias furnieri* e sistemática molecular da maria-da-toca *Bathygobius saporator***. Rio de Janeiro; 2005. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Luton K, Walker D, Blair D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). Mol Bioch Parasitol 1992;56:323-328.

MacKenzie K. Parasites as indicators of host populations. Int J Par 1987;17: 345-352.

MacKenzie K, Campbell N, Mattiucci S, Ramos P, Pinto AL, Abaunza P. 2008. Parasites as biological tags for stock identification of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus*. Fish Res 2008;89:136–145.

Marigo J. Patologia Comparada das Principais Enfermidades Parasitárias de Mamíferos Marinhos encontrados na Costa Sudeste e Sul do Brasil. São Paulo; 2003 Mestrado [Dissertação em Ciências Biológicas]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Marigo J, Rosas FCW, Andrade ALV, Oliveira MR, Dias RA, Catão-Dias JL. Parasites of *Pontoporia blainvillei* from São Paulo and Paraná States, Brazil. LAJAM 2002;1(1):115-122.

McCoy KD, Boulinier T, Tirard C, Michalakis Y. Host dependent genetic structure of parasite populations: differential dispersal of seabird tick host races. Evolution 2003; 57: 288–296.

McCoy KD, Boulinier T, Tirard C. Comparative host-parasite population structures: disentangling prospecting and dispersal in the black-legged kittiwake *Rissa tridactyla*. *Mol Ecol* 2005;14:2825–2838.

Mendez M, Rosenbaum HC, Bordino P. Conservation genetics of the franciscana dolphin in Northern Argentina: population structure, by-catch impacts, and management implications. *Conserv Genet* 2007; 9(2):419-435.

Ministério do Meio Ambiente- MMA. **Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção**. Brasília: 2008 janeiro. Disponível na internet via www.ibama.gov.br/cemave/download.php?id_download=55 [Arquivo capturado em 20 de janeiro de 2008].

Morgan JA, Blair D. Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group. *Parasitology* 1995;111(Pt 5):609-15.

Moser M. Parasites as biological tags. *Parasitol Today*. 1991;7(7):182-185.

Nolan MJ, Cribb TH. The use and implications of ribosomal DNA sequencing and discrimination of Digenean species. *Adv Parasitol* 2005;60:101-163.

Oliveria MR. **Ecologia alimentar de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Delphinidae) no litoral sul do Estado de São Paulo e Paraná**. Curitiba; 2003. Mestrado [Dissertação] - Universidade Federal do Paraná.

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

Olson PD, Tkach VV. Advances and trends in the molecular systematics of the parasitic Platyhelminthes. *Adv Parasitol* 2005; 60:165-243.

Ott PH, Oliveira LR, Barreto AS, Secchi ER, Almeida RS, Moreno IB et al. Unidades de manejo da toninha, *Pontoporia blainvillei*: uma avaliação molecular do limite entre as FMAs II e III. [Resumo apresentado à XII Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur y 7º Congreso SOLAMAC; 2008 out. 13-17; Montevideo] p. 29.

Ott PH, Secchi ER, Moreno IB, Danilewicz D, Crespo EA, Bordino, P.; et al. Report of the working group on fishery interactions. LAJAM 2002:1(1):55-64.

Pedraza S. 2008. **Ecología poblacional de la tonina overa *Cephalorhynchus commersonii* (Lacépède, 1804) en el litoral patagónico.** Buenos Aires; 2008. [Tese de Doutorado em Biología] - Universidad de Buenos Aires.

Pinedo MC. **Development and variation of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*).** Santa Cruz; 1991. [Tese de Doutorado] - University of California.

Pinedo MC. **Análises dos conteúdos estomacais de *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny, 1844) e *Tursiops gephyreus* (Lahille, 1908) (Cetacea, Platanistidae e Delphinidae) na zona estuarial e costeira do Rio Grande, RS, Brasil.** Rio Grande; 1982. Mestrado [Dissertação em Oceanografia Biológica] - Fundação Universidade do Rio Grande.

Praderi R. Mortalidad de Franciscana, *Pontoporia blainvillei*, en pesquerías artesanales de tiburón en la costa atlántica uruguaya. Actas III Reunión Iberoamericana de Conservación y Zoología de Vertebrados. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales .Bernardino Rivadavia, Zoología XIII.1984; (1-60): 259-272.

Price PW. **Evolutionary Biology of Parasites**. Princeton: Princeton University Press. 1980.

Price EW. Trematode parasites of marine mammals. Proc US Nat Mus 1932; 81: 1-68.

Raga JA, Aznar FJ, Balbuena JA, Dailey M D. *Hadwenius pontoporiae* sp. N. (Digenea: Campulidae) from the intestine of Franciscana (Cetacea: Pontoporidae) in Argentinian waters. J Helm Soc Wash 1994;61(1):45-49.

Redmond NE, McCormack GP. Large expansion segments in 18S rDNA support a new sponge clade (Class Demospongiae, Order Haplosclerida). Mol Phylogenet Evol 2008;47:1090–1099.

Rodrigues AR, Gasalla MA. 2008. Spatial and temporal patterns in size and maturation of *Loligo plei* and *Loligo sanpaulensis* (Cephalopoda: Loliginidae) in southeastern Brazilian waters, between 23°S and 27°S. Sci Mar 72(4), December 2008, 631-643. ISSN 0214-8358 doi: 10.3989/scimar.2008.72n4631

Salgado-Laboriau ML. **História Ecológica da Terra**. São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda, 1996.

Santos CP, Rohde K, Ramos R, Di Benedetto AP. Helminths of cetaceans on the southeastern coast of Brazil. J Helm Soc Wash 1996; 63(1):149-152.

Santos S, Hrbek T, Farias IP, Schneider H, Sampaio I. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep. Mol Ecol 2006;15:4361–4373.

Sardiña P, Lopez-Cazorla L. Feeding interrelationships and comparative morphology of two young sciaenids co-occurring in South-western Atlantic waters. Hydrobiologia 2005;548:41–49.

Secchi ER, Ott PH, Danilewicz D. Effects of fishing by-catch and the conservation status of the franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. **In:** Gales N, Hindell M, Kirkwood R (eds) **Marine mammals: fisheries, tourism and management issues**. Collingwood, Australia: CSIRO Publishing, 2003a. p. 174–191

Secchi ER, Danilewicz D, Ott PH. Applying the phylogeographic concept to identify franciscana dolphin stocks: implication to meet management objectives. *J Cetac Res Manag* 2003b; 5(1):61-68.

Secchi ER, Danilewicz D, Ott PH, Ramos R, Lazaro M, Marigo J., Wang JY. 2002. Report of the Working Group on Stock Identity. *LAJAM* 2002;1(1): 47-54.

Secchi ER, Zerbini AN, Bassoi M, Dalla Rosa L, Moller LM, Rocha-Campos CC. Mortality of franciscanas, *Pontoporia blainvillei*, in coastal gillnetting in southern Brazil: period 1994 - 1995. *Rep Int Whal Commn* 1997; 47:653-658.

Secchi ER, Wang JY, Murray BW, Rocha-Campos CC, White BN. Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic locations in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences. *Can J Zool* 1998;76(9):1622-1627.

Siciliano S, Di Benedetto APM, Ramos RMA. A toninha, *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea, Pontoporiidae), nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, Sudeste do Brasil: caracterização dos habitats e fatores de isolamento das populações. *Bol Mus Nac* 2002; 476:1-15.

Stunkard HW, Alvey CH. The morphology of *Zalophotrema hepaticum*, with a review of the trematode family Fasciolidae. *Parasitology* 1930; 22: 328-333.

Szidat L. La Parasitología como ciencia auxiliar para la biogeografía de organismos marinos. Boletín del Instituto de Biología Marina 1964;7:51-55.

Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 1989;123:585-595.

Timi JT. Parasites as biological tags for stock discrimination in marine fish from South American Atlantic waters. J Helminthol 2007;ISSN 0022-149X, 81(2): 107-111.

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

Vilas R, Criscione CD, Blouin MS. A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. Parasitology 2005; 131:839-846.

Vilas R, Paniagua E, Sanmartín ML. Genetic variation within and among infrapopulations of the marine digenetic trematode *Lecithochirium fusiforme*. Parasitology 2003;126:465-472.

Voigt O, Erpenbeck D, Wörheide G. Molecular evolution of rDNA in early diverging Metazoa: First comparative analysis and phylogenetic application of complete SSU rRNA secondary structures in Porifera. BMC Evol Biol 2008; 8:69.

Zarowiecki MZ, Huyse T, Littlewood DTJ. Making the most of the mitochondrial genomes- Markers for phylogeny, molecular ecology and barcodes in *Schistosoma* (Platyhelminthes: Digenea). Int J Parasitol 2007;37:1401-1418.

Walker WA. Geographical variation of the parasite, *Phyllobothrium delphini* (Cestoda), in Pacific Dall's porpoises, *Phocoenoides dalli*, in the northern North Pacific, Bering Sea, and Sea of Okhotsk. Mar Mamm Sci 2001;17(2):264-275.

Wang JY. Soctk identity. **In:** William FP, Bernd W, Thewissen JGM (eds). **Encyclopedia of Marine Mammals (Second Edition)**. Academic Press, 2009. p. 115-118.

Wright S. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating. Evolution 1965;19:395-420.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)