

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

JORDANA COSTA ALVES DE ASSIS

TAXONOMIA INTEGRATIVA DE TREMATÓDEOS DE ANIMAIS DOMÉSTICOS
E SILVESTRES OCORRENTES EM UM LAGO URBANO DE BELO HORIZONTE,
MINAS GERAIS, BRASIL

JORDANA COSTA ALVES DE ASSIS

TAXONOMIA INTEGRATIVA DE TREMATÓDEOS DE ANIMAIS DOMÉSTICOS
E SILVESTRES OCORRENTES EM UM LAGO URBANO DE BELO HORIZONTE,
MINAS GERAIS, BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
à obtenção do título de Doutora em Parasitologia.

Área de concentração: Helminologia

Orientador: Prof. Hudson Alves Pinto

Belo Horizonte

Outubro, 2020

- 043 Assis, Jordana Costa Alves de.
Taxonomia integrativa de trematódeos de animais domésticos e silvestres
ocorrentes em um lago urbano de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil
[manuscrito] / Jordana Costa Alves de Assis. – 2020.
265 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Hudson Alves Pinto.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.
1. Parasitologia. 2. Gastrópodes. 3. Trematódeos. 4. Taxonomia. I. Pinto,
Hudson Alves. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências
Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO
Jordana Costa Alves de Assis

309/2020/07
entrada
1º/2016
2016703568

Às oito horas e trinta minutos do dia 30 de outubro do ano de 2020, reuniu-se, por videoconferência, sala <https://conferenciaweb.mp.br/webconf/udson-alves-pinto>, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "Taxonomia integrativa de trematódeos de animais domésticos e silvestres ocorrentes em um lago urbano de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, área de concentração: **Helminologia**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Hudson Alves Pinto**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Hudson Alves Pinto	UFMG	Aprovada
Dra. Claudia Portes Santos Silva	IOC/ FIOCRUZ-RJ	Aprovada
Dra. Silvana Aparecida Carvalho Rogel Thiengo	IOC/ FIOCRUZ-RJ	Aprovada
Dr. Arnaldo Maldonado Junior	IOC/ FIOCRUZ-RJ	Aprovada
Dr. Felipe Bisaggio Pereira	UFMG	Aprovada

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	Ausentes.
Recomendações	As recomendações foram repassadas à candidata.
Sugestões	As sugestões foram repassadas à candidata.

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 30 de outubro de 2020.

Dr. Hudson Alves Pinto

(Orientador)

Dra. Claudia Portes Santos Silva

Dra. Silvana Aparecida Carvalho Rogel Thiengo

Dr. Arnaldo Maldonado Junior

Dr. Felipe Bisaggio Pereira

Ciclos

Aqui está o trabalho de alguns anos recentes, fruto de aprendizado, dedicação e companheirismo. Para além, digo que o início de tudo se deu quando minha mãe e minha primeira professora me ajudaram a segurar um lápis na mão. Caminho sem volta. E são a estas mulheres a quem dedico especialmente este estudo. Hoje, olho para aquela pequena e todos que estiveram e estão ao meu lado e sou apenas gratidão.

“Vêde: o pé do ypê (apenas Mente) flora,

Revolucionariamente,

a - penso ao pé da serra.”

Ypê, Belchior

AGRADECIMENTOS

Gratidão a algo maior, que vejo e sinto nos pequenos milagres e acontecimentos da vida, como também nos momentos difíceis. Tudo passa.

À minha família que me apoia em todas as jornadas. Em especial à minha mãe, Celina Costa Pinto, a qual, me espelho por sua força, bondade e caráter. Ao meu irmão e melhor amigo Janderson Alves Costa de Assis, que sempre esteve ao meu lado e espero que seguiremos assim. Também à minha avó Arlete Costa Pinto, por me ensinar tanto, apenas com sua simplicidade, perseverança e gratidão à vida. Obrigada por estarem sempre comigo e pelo pouso aconchegante e seguro.

Aos meus amigos, que por vezes me diziam sobre minha ausência. É sabido que vocês estão sempre presentes em meus pensamentos e boas vibrações.

Ao meu orientador Hudson Alves Pinto, que me acolheu no Laboratório de Biologia de Trematoda, proporcionando aprendizado infinito sobre esse fabuloso universo da Taxonomia, sempre dedicado a ensinar com paciência, a ser compreensivo com minhas dificuldades e a me acompanhar no campo e nos procedimentos laboratoriais, me incentivando a estar aprimorando a cada dia. Sou agradecida por você ter aceitado esse desafio e acreditado em meu potencial.

Ao senhor Airton Lobo, que tenho como a um grande amigo e mestre. Sempre muito atencioso, gentil e disposto a uma boa prosa e a ensinar as melhores técnicas aprendidas ao longo de décadas com muito esmero. Um trabalho científico, mas que lembra arte.

Aos meus colegas de laboratório, em especial, aqueles que me acompanham desde o início, com ensinamentos, companherismo e cooperação: Eduardo Pulido Murillo, Danimar Hernández e Marisa Caixeta. Agradeço também à Nicole Quaresma, que me auxiliou durante as pesquisas de campo com prestatividade e ânimo.

Ao professor Alan Lane de Melo pelos ensinamentos, questionamentos e experiências que me fez pensar além do óbvio.

Ao professor Nelson Martins, da Escola de Veterinária da UFMG, pela colaboração e prestatividade na execução deste trabalho, além das ótimas idéias e conversas.

À Sumara Aparecida, que esteve ao meu lado desde o momento que ingressei no Programa, com bons conselhos, me dando força e torcendo por acontecimentos bons na minha caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, por permitir que eu pudesse realizar essa caminhada, prestando aos seus integrantes as melhores possibilidades de aprendizado em ensino, pesquisa e extensão, assim como aos professores que se dedicam a ensinar com profissionalismo e cuidado. Meus cumprimentos e agradecimentos à atual coordenadora deste programa, Professora Daniella Castanheira Bartholomeu.

À Ana Paula Oliveira, por sempre ter estado disposta a me ajudar na comutação de artigos, buscando com muita habilidade as pérolas científicas no fundo do baú, além da boa prosa e incentivo.

Aos funcionários da Cidade Administrativa de Minas Gerais pelo trabalho colaborativo, em especial, ao Ronaldo Amaral que acompanhou de perto minhas ações com satisfação e entusiasmo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter sido a agência de fomento para a bolsa de doutorado, assim como demais produções científicas.

Também agradeço à professora e pesquisadora Niède Guidon que, sem ao menos conhecê-la pessoalmente, mostrou-me ainda durante a infância que meninas podem ser grandes cientistas.

À Alexandra Asanovna, por acreditar que removendo as barreiras da Ciência, me ajudaria nos estudos.

Enfim, obrigada aqueles que de alguma forma me ajudaram a estar aqui, caminhando e aprendendo sempre. Deu certo!

*“Abacateiro, acataremos teu ato
Nós também somos do mato como o pato e o leão
Aguardaremos, brincaremos no regato
Até que nos tragam frutos, teu amor, teu coração*

*Abacateiro, teu recolhimento é justamente
O significado da palavra temporão
Enquanto o tempo não trazer teu abacate
Amanhecerá tomate e anoitecerá mamão*

*Abacateiro, sabes ao que estou me referindo
Porque todo tamarindo tem
O seu agosto azedo, cedo, antes
Que o janeiro doce manga venha ser também”*

Refazenda, Gilberto Gil

RESUMO

Sabe-se que as regiões tropicais do globo são aquelas que concentram a maior biodiversidade do planeta, a qual inclui os trematódeos, parasitos com ciclo de vida complexo, envolvendo uma vasta gama de hospedeiros intermediários e definitivos. Apesar da importância médica, veterinária e ecossistêmica destes parasitos, ainda há uma grande lacuna no conhecimento sobre suas interações com seus hospedeiros e o ambiente, em especial no Brasil. Com objetivo de contribuir para o conhecimento da taxonomia e biologia de trematódeos encontrados no Brasil, coletas malacológicas, estudos experimentais e a avaliação de alguns vertebrados domésticos e silvestres foram realizados na Lagoa da Cidade Administrativa do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, entre janeiro de 2017 a maio de 2019. A identificação taxonômica dos trematódeos encontrados, até a menor categoria possível, foi baseada em análises morfológicas e/ou moleculares [marcadores ribossomais (28S e ITS) e mitocondriais (*Cox-1* e *Nad-1*)]. Na avaliação malacológica foram coletados 9.508 gastrópodes pertencentes a cinco espécies (*Melanoides tuberculata*, *Biomphalaria straminea*, *Pomacea* sp., *Physa acuta*, e *Pseudosuccinea columella*), sendo as três primeiras encontradas infectadas por larvas de trematódeos. Dentre os vertebrados estudados, três espécies de anseriformes domésticos [patos, *Cairina moschata domestica* (N= 47), marrecos, *Anas platyrhynchos domesticus* (N= 8), e gansos, *Anser cygnoides domesticus* (N= 6)] foram avaliados *in vivo* através de exame oftálmico direto e análise coproparasitológica. Adicionalmente, animais silvestres encontrados sem vida no local [frango-d'água, *Gallinula galeata* (N=1), capivara, *Hydrochoerus hydrochaeris* (N=2) e 6 espécies de peixes, acará, *Australoheros* sp. (N= 38), traíra, *Hoplias malabaricus* (N= 5), lebistes, *Poecilia reticulata* (N= 9), e alevinos de tilápia, *Oreochromis niloticus* (N=6)], foram necropsiados para a pesquisa de helmintos. Entre os parasitos encontrados, sete espécies [*Cotylurus* sp., Crassiphialinae gen. sp., *Drepanocephalus* sp., *Hysteromorpha* sp., Diplostomidae gen. sp., Spirorchiidae gen. sp. em *B. straminea*, e *Renicola* sp. em *M. tuberculata*] foram identificadas apenas em moluscos. A infecção experimental iniciada a partir de cercárias do tipo Megalura encontradas em *M. tuberculata* possibilitou a recuperação, em *Gallus gallus domesticus*, de vermes oculares identificados como *Philophthalmus gralli*, sendo estudos visando padronizar técnicas de diagnóstico e tratamento desta parasitose realizados. A abordagem experimental também realizada a partir de cercárias do tipo Anfistoma emergidas de *B. straminea* possibilitaram a obtenção, em *Mus musculus*, de parasitos adultos identificados como *Zygodcotyle lunata*,

sendo que estudos filogenéticos realizados pela primeira vez confirmaram a inclusão da espécie na família Zygotocylidae, bem como a sua ampla distribuição no continente americano. Nos peixes, metacercárias de *Apharyngostrigea* sp. e *Centrocestus formosanus* foram recuperadas em *P. reticulata*, sendo cercárias desta última também identificadas em *M. tuberculata*. Metacercárias de *Clinostomum* sp. foram obtidas de *Australoheros* sp. e os dados morfológicos e moleculares revelaram tratar de uma espécie distinta das reportadas no continente americano. Em *H. malabaricus* foram recuperadas metacercárias de *Tylodelphys* sp., espécie que no estudo filogenético se agrupou com outros isolados americanos do gênero, mas como espécie distinta. Entre as aves avaliadas, quatro espécies, *P. gralli*, *Typhlocoelum cucumerinum*, *Z. lunata* e uma espécie não identificada, foram encontradas nos anseriformes domésticos. Destas, *P. gralli* e *T. cucumerinum* foram associadas molecularmente com formas larvais obtidas em *M. tuberculata* e *B. straminea*, respectivamente, resultando em novas informações sobre a epizootia destas doenças aviárias em um centro urbano. No exemplar de *G. galeata*, além de *P. gralli*, foram encontrados *Cyclocoelum mutabile* e *Echinostoma* sp. Os dados moleculares confirmaram a ampla distribuição de *C. mutabile*, espécie encontrada nas Américas e Europa e revelaram que *Echinostoma* sp., não identificado em nível específico devido à perda de espinhos do colar cefálico, pertence ao grupo *revolutum*. Em *H. hydrochaeris* foram identificadas *Fasciola hepatica*, *Taxorchis* sp. e *Hippocrepis hippocrepis*. O encontro de *F. hepatica* neste centro urbano, aponta para o risco de transmissão deste agente antroponozoonótico. Embora *Taxorchis* sp. não pôde ser identificado especificamente pela falta de exemplares completamente desenvolvidos, os dados moleculares obtidos representam as primeiras sequências e análise filogenética envolvendo cladorquídeos de mamíferos. Quanto a *H. hippocrepis*, a abordagem molecular possibilitou a associação deste parasito com a larva do tipo *Monostoma* frequentemente recuperada de *B. straminea* bem como a avaliação de sua posição filogenética frente a outros membros da superfamília Notocotyloidea. Com a utilização de abordagem taxonômica integrativa no estudo de trematódeos neste lago, foi possível a identificação de 21 espécies. A elucidação de aspectos do ciclo biológico de alguns destes e várias das interações biológicas observadas são registradas pela primeira vez no país.

Palavras-chave: ciclo biológico, gastrópodes, taxonomia, trematódeos, hospedeiros vertebrados

ABSTRACT

It is known that tropical regions of the globe are those that concentrate the greatest biodiversity on the planet, which includes trematodes, parasites with complex life cycles, involving a wide range of intermediate and definitive hosts. Despite the medical, veterinary, and ecosystem importance of these parasites, there is still a large gap in knowledge about their interactions with their hosts and the environment, especially in Brazil. In order to contribute to the knowledge of the taxonomy and biology of trematodes found in Brazil, malacological surveys, experimental studies, and the evaluation of some domestic and wild vertebrate were carried out at a lake located at Minas Gerais State Administrative Center, in the State of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, between January 2017 and May 2019. The taxonomic identification of the trematodes, at the lowest taxonomic levels possible, was based on morphological and/or molecular analyzes [ribosomal (28S and ITS) and mitochondrial (*Cox-1* and *Nad-1*) markers]. In the malacological survey, 9.508 gastropods belonging to five species (*Melanooides tuberculata*, *Biomphalaria straminea*, *Pomacea* sp., *Physa acuta*, and *Pseudosuccinea columella*) were collected, of which the first three were found infected with larval trematodes. Among the vertebrates studied, three species of domestic Anseriformes [ducks, *Cairina moschata domestica* (N= 47), mallards, *Anas platyrhynchos domesticus* (N= 8), and geese, *Anser cygnoides domesticus* (N= 6)] occurring at the locality were evaluated *in vivo* through direct ophthalmic examination and coproparasitological analysis. In addition, wild animals found death at the locality [waterfowl, *Gallinula galeata* (N=1), capybara, *Hydrochoerus hydrochaeris* (N=2) and six species of fish, “acara”, *Australoheros* sp. (N = 38), trahira, *Hoplias malabaricus* (N = 5), guppies, *Poecilia reticulata* (N = 9) and tilapia fry, *Oreochromis niloticus* (N = 6)], were necropsied for helminth research. Among the parasites found, seven species [*Cotylurus* sp., Crassiphialinae gen. sp., *Drepanocephalus* sp., *Hysteromorpha* sp., Diplostomidae gen. sp., Spirorchiidae gen. sp. in *B. straminea*, and *Renicola* sp. in *M. tuberculata*] were identified only in mollusks. Experimental infection performed with cercariae of the Megalurous type found in *M. tuberculata* made it possible to recover, in *Gallus gallus domesticus*, eye worms identified as *Philophthalmus gralli*, and studies aiming to standardize the diagnostic and treatment techniques were performed. The experimental approach carried out from cercariae of the Amphistome type emerged from *B. straminea* made it possible to obtain, in *Mus musculus*, adult parasites identified as *Zygocotyle*

lunata. Phylogenetic studies carried out for the first time with this species confirmed the inclusion of the species in the family Zygodactylidae as well as its wide distribution in the American continent. In fish, metacercariae of *Apharyngostrigea* sp. and *Centrocestus formosanus* were recovered from *P. reticulata*, with cercariae of the latter also identified in *M. tuberculata*. Metacercariae of *Clinostomum* sp. were obtained from *Australoheros* sp. and the morphological and molecular data revealed to be dealing with a species distinct from others reported in the American continent. In *H. malabaricus*, metacercariae of *Tyloodelphys* sp. were recovered, a species that in the phylogenetic study grouped with other American isolates of the genus, but proved to be a distinct species. Among the birds evaluated, four species, *P. gralli*, *Typhlocoelum cucumerinum*, *Z. lunata* and an unidentified species, were found in domestic anseriformes. Of these, *P. gralli* and *T. cucumerinum* were molecularly associated with larval forms obtained from *M. tuberculata* and *B. straminea*, respectively, resulting in new information on the epizooty of these avian diseases in an urban center. In the specimen of *G. galeata*, in addition to *P. gralli*, *Cyclocoelum mutabile*, and *Echinostoma* sp. Molecular data confirmed the wide distribution of *C. mutabile*, a species found in the Americas and Europe, and revealed that *Echinostoma* sp., not identified at a specific level due to the loss of collar spines belongs to the *revolutum* group. In *H. hydrochaeris*, it was identified *Fasciola hepatica*, *Taxorchiis* sp. and *Hippocrepis hippocrepis*. The finding of *F. hepatica* in this urban center points to the risk of transmission of this anthroponotic agent. Although *Taxorchiis* sp. could not be identified at specific level due the lack of fully developed specimens, the molecular data obtained represent the first sequences and phylogenetic analysis involving mammalian cladorchiids. As for *H. hippocrepis*, the molecular approach enabled to link this parasite and the cercaria of the Monostome type frequently recovered from *B. straminea*, besides to evaluate its phylogenetic position in relation to other members of the superfamily Notocotyloidea. With the use of an integrative taxonomic approach in the study of trematodes in this lake, it was possible to identify 21 species. The elucidation of aspects of the life cycle of some of these and several of the observed biological interactions are recorded for the first time in the country.

Keywords: life cycle, gastropods, taxonomy, trematodes, vertebrate hosts

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

Ad: Adulto	ml: Mililitro
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais	mm: Milímetro
cm: Centímetro	mtDNA: Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid
COI: Citocromo Oxidase Subunidade I	Nad-1: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase Subunit-1
dpi: Dias após infecção	ND: Não determinado
EDTA: Ácido etilendiamino tetra-acético	NI: Não identificado
EOD: Exame Oftálmico Direto	nm: Nanômetro
EV: Escola de Veterinária	OIE: World Organization for Animal Health
Fe: Fêmea	PCR: Polymerase Chain Reaction
ICB: Instituto de Ciências Biológicas	rDNA: Ribossomal Deoxyribonucleic Acid
ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade	rpm: Rotações por minuto
Im: Imaturo	rRNA: Ribossomal Ribonucleic Acid
ITS: Internal Transcribed Spacer	SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
Kg: Quilograma	SISGEN: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
LCADM-MG: Lagoa da Cidade Administrativa do Estado de Minas Gerais	SSU: Small Subunit (18S)
LSC: Lavagem de Saco Conjuntival	TAE: Tri-acetato-EDTA
LSU: Large Subunit (28S)	µl: Microlitro
Ma: Macho	W: Watt
M: Molar	WHO: World Health Organization
mg: Miligramas	
min: Minutos	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Coleção dulcícola localizada na Cidade Administrativa do Estado de Minas Gerais.....	41
Figura 2. Vista aérea da lagoa principal da Cidade Administrativa e os pontos selecionados para coleta malacológica.....	42
Figura 3. Caracterização de área da LCADM-MG.....	44
Figura 4. Estudos a campo em anseriformes domésticos da LCADM-MG.....	49
Figura 5. Pontos de coleta malacológica na LCADM-MG no período chuvoso (fevereiro de 2017) e seco (setembro de 2017).	61
Figura 6. Infecção experimental por <i>P. gralli</i> realizada em <i>G. g. domesticus</i>	70
Figura 7. Trematódeos identificados por exame parasitológico direto com material fecal de anseriformes domésticos presentes na LCADM-MG.....	74
Figura 8. Metacercárias de <i>Clinostomum</i> sp. encistadas em <i>Australoheros</i> sp. proveniente da LCADM-MG	78
Figura 9. Achados de necropsia em <i>Gallinula galeata</i> proveniente da LCADM-MG... ..	80
Figura 10. Achados de necropsia em <i>H. hydrochaeris</i> provenientes da LCADM-MG .	82
Figura 11. Metacercária de <i>Clinostomum</i> sp. obtida de <i>Australoheros</i> sp.	85
Figura 12. Árvore filogenética gerada com utilização sequências dos alinhamentos de DNA ribossomal 28S de clinostomídeos.....	89
Figura 13. Árvore filogenética gerada com utilização de sequências dos alinhamentos de DNA ribossomal ITS de clinostomídeos	90
Figura 14. Árvore filogenética (IB) gerada a partir de sequências dos alinhamentos de DNA mitocondrial Citocromo Oxidase de trematódeos do gênero <i>Clinostomum</i> das Américas.....	91
Figura 15. Formas larvais de trematódeos da superfamília Diplostomoidea obtidas de <i>Biomphalaria straminea</i> proveniente da LCADM-MG	96
Figura 16. Metacercárias de <i>Tylodelphys</i> sp. obtidas de <i>H. malabaricus</i> proveniente da LCADM-MG.....	98
Figura 17. Árvore filogenética gerada com utilização de DNA ribossomal ITS de trematódeos da superfamília Diplostomoidea proveniente da LCADM-MG	101
Figura 18. <i>C. mutabile</i> recuperado de <i>G. galeata</i> infectado naturalmente, proveniente da LCADM-MG.....	104
Figura 19. Árvore filogenética gerada com utilização de sequências dos alinhamentos de DNA ribossomal 28S de trematódeos da superfamília Echinostomatoidea.....	107

Figura 20. Árvore filogenética gerada com utilização de sequências dos alinhamentos de DNA mitocondrial Nad-1 de trematódeos da superfamília Echinostomatoidea	108
Figura 21. Formas larvais de <i>T. cucumerinum</i> recuperadas de <i>B. straminea</i> infectados naturalmente, proveniente da LCADM-MG	111
Figura 22. <i>Typhlocoelum cucumerinum</i> recuperado de um espécime de <i>C. moschata</i> infectado naturalmente, proveniente da LCADM-MG.....	112
Figura 23. <i>Echinostoma</i> sp., recuperado de um espécime <i>Gallinula galeata</i> infectado naturalmente, proveniente da LCADM-MG	116
Figura 24. Espécimes de <i>Fasciola hepatica</i> recuperados dos ductos hepáticos de <i>H. hydrochaeris</i> , provenientes da LCADM-MG.....	120
Figura 25. <i>P. gralli</i> : Adultos obtidos de anseriformes domésticos e <i>G. galeata</i> de vida livre provenientes da LCADM-MG e de <i>G. g. domesticus</i> infectado experimentalmente	125
Figura 26. Espécimes de <i>Taxorchis</i> sp. recuperados de <i>H. hydrochaeris</i> provenientes da LCADM-MG	129
Figura 27. Árvore filogenética gerada com utilização de sequências dos alinhamentos de DNA ribossomal ITS-2 de trematódeos da superfamília Paramphistomoidea	131
Figura 28. Árvore filogenética gerada com utilização de sequências dos alinhamentos de DNA mitocondrial Citocromo Oxidase região pós barcode de trematódeos da superfamília Paramphistomoidea	132
Figura 29. Formas evolutivas de <i>Zygodontia cyclops</i> provenientes de <i>B. straminea</i> e experimentalmente em <i>Mus musculus</i>	135
Figura 30. Árvore filogenética gerada com utilização de sequências dos alinhamentos de DNA ribossomal 28S de trematódeos da superfamília Paramphistomoidea.....	138
Figura 31. Árvore filogenética gerada com utilização de sequências dos alinhamentos de DNA mitocondrial Citocromo Oxidase região barcode de trematódeos da superfamília Paramphistomoidea	139
Figura 32. Formas imaturas de <i>Hippocrepis hippocrepis</i> obtidas de <i>Biomphalaria straminea</i> provenientes da LCADM-MG.....	141
Figura 33. Espécime adulto de <i>Hippocrepis hippocrepis</i> recuperado de <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> na LCADM-MG	143
Figura 34. Árvore filogenética gerada com utilização de sequências dos alinhamentos de DNA ribossomal 28S de trematódeos da superfamília Pronocephaloidea	146
Figura 35. Metacercárias recuperadas de <i>Poecilia reticulata</i> proveniente da LCADM-MG	148

Figura 36. Larvas encontradas exclusivamente em moluscos provenientes da LCADM-MG.....	152
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de animais vertebrados encontrados sem vida provenientes da LCADM-MG avaliados quanto à infecção por trematódeos digeneicos.....	51
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para a amplificação de regiões de DNA ribossomal e mitocondrial, assim como condições de PCR e tamanho dos amplicons utilizados para amostras de trematódeos digeneicos provenientes da LCADM-MG	56
Tabela 3. Moluscos coletados, número total, infectados e prevalência por larvas de trematódeos sem considerar os pontos de coleta, observados durante estudo malacológico realizado na LCADM-MG, Brasil no período de janeiro (2017) a março (2018).....	62
Tabela 4. Moluscos coletados, número total, infectados e prevalência de espécimes infectados por larvas de trematódeos sem considerar os pontos de coleta, observados durante estudo malacológico realizado na LCADM-MG no período de junho (2018) a maio (2019)	63
Tabela 5. Moluscos coletados, número total, infectados e prevalência de espécimes infectados por larvas de trematódeos sem considerar os pontos de coleta, observados durante estudo malacológico realizado na LCADM-MG no período de janeiro (2017) a maio (2019)	63
Tabela 6. Espécimes de <i>Biomphalaria straminea</i> coletados na LCADM-MG no período de janeiro de 2017 a março de 2018 em distintos pontos de coleta.....	64
Tabela 7. Espécimes de <i>Melanoides tuberculata</i> coletados na LCADM-MG no período entre janeiro de 2017 a março de 2018 em distintos pontos de coleta	66
Tabela 8. Identificação dos anseriformes domésticos infectados por trematódeo ocular na LCADM-MG e número de espécimes recuperados	72
Tabela 9. Identificação de hospedeiros vertebrados encontrados sem vida provenientes da LCADM-MG, Brasil, assim como a identificação dos trematódeos recuperados	76
Tabela 10. Dados morfométricos obtidos de metacercárias do gênero <i>Clinostomum</i> sp. recuperadas de <i>Australoheros</i> sp. provenientes da LCADM-MG e dados reportados de metacercárias de distintas espécies e autores	86
Tabela 11. Dados morfométricos obtidos de metacercárias do gênero <i>Tylodelphys</i> sp. recuperadas de <i>H. malabaricus</i> provenientes da LCADM-MG e dados reportados de espécies por diferentes autores.	99

Tabela 12. Dados morfométricos obtidos de <i>C. mutabile</i> recuperados de <i>G. galeata</i> da LCADM-MG e dados reportados do trematódeo por diferentes autores.	105
Tabela 13. Dados morfométricos de espécimes do gênero <i>Echinostoma</i> já descritos no Brasil.....	117
Tabela 14. Dados morfométricos de <i>Philophthalmus gralli</i> recuperados de diferentes espécies de aves na LCADM-MG.....	126
Tabela 15. Dados morfométricos obtidos de <i>Hippocrepis hippocrepis</i> obtidas de capivaras da LCADM-MG e dados reportados para <i>Hippocrepis</i> spp. da América do Sul por diferentes autores.....	144

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Compilação dos ciclos biológicos de trematódeos encontrados na LCADM-MG.....	154
--	-----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Aspectos gerais sobre a biologia de trematódeos	15
1.1.1 Ovos e miracídios.....	15
1.1.2 Esporocistos	16
1.1.3 Rédias	17
1.1.4 Cercárias.....	18
1.1.5 Metacercárias	20
1.1.6 Trematódeo digeneico adulto	21
1.2 Interações entre trematódeos, hospedeiros, ambiente e seus impactos.....	22
1.3 O conhecimento sobre a biodiversidade de trematódeos digeneicos.....	26
1.3 Abordagens utilizadas no estudo dos trematódeos	27
1.3.1 Estudos tradicionais.....	27
1.3.2 Biologia molecular	29
1.3.3 Taxonomia integrativa na sistemática de trematódeos.....	32
1.3.4 Histórico da taxonomia de trematódeos no Brasil: do período colonial às atualidades.....	33
2. JUSTIFICATIVA.....	37
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo geral	38
3.1.2 Objetivos específicos.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Breve histórico	39
4.2 Considerações éticas	39
4.3 Área de estudo	40
4.3.1 Caracterização geral da localidade	40
4.3.2 Pontos de coleta e caracterização dos <i>microhabitats</i>	42
4.3.2.1 Delineamento.....	42
4.2.3.2 Caracterização da área	42
4.4 Coleta de moluscos e análise de infecção	45
4.5 Infecção experimental de hospedeiros vertebrados	46
4.5.1 Infecção em <i>Gallus gallus domesticus</i>	46
4.5.2 Infecção em <i>Mus musculus</i>	47
4.6 Coleta de amostras biológicas em anseriformes	48
4.7 Avaliação de animais vertebrados encontrados sem vida.....	50

4.8 Taxonomia Integrativa.....	52
4.8.1 Estudo morfológico.....	52
4.8.2 Estudo molecular.....	53
4.8.2.1 Extração e quantificação de DNA.....	53
4.8.2.2 Amplificação.....	55
4.8.2.3 Purificação.....	57
4.8.2.4 Sequenciamento.....	57
4.8.2.5 Análise das sequências.....	58
5. RESULTADOS.....	59
5.1 Considerações sobre os pontos de coleta e procedimentos realizados.....	59
5.2 Coleta de moluscos e infecção por larvas de trematódeos.....	62
5.2.1 <i>Biomphalaria straminea</i>	64
5.2.2 <i>Melanoides tuberculata</i>	66
5.2.3 <i>Pomacea</i> sp.	67
5.3 Infecções experimentais em vertebrados.....	68
5.3.1 <i>Gallus gallus domesticus</i>	68
5.3.2 <i>Mus musculus</i>	71
5.4 Resultado das intervenções a campo em vertebrados.....	71
5.4.1 Infecção por trematódeos em anseriformes domésticos.....	71
5.4.1.1 Trematódeo ocular.....	71
5.4.1.2 Exame parasitológico fecal em anseriformes da LCADM-MG.....	73
5.5 Trematódeos em vertebrados encontrados sem vida na LCADM-MG.....	75
5.6 Análise dos hospedeiros <i>post mortem</i>	77
5.6.1 Achados de necropsia em peixes.....	77
5.6.2 Achados de necropsia em <i>Gallinula galeata</i>	79
5.6.3 Achados de necropsia em <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	81
5.7 Estudo morfológico e molecular dos trematódeos digeneicos.....	83
5.7.1 Trematódeos da Ordem Diplostomida.....	83
5.7.1.1 <i>Clinostomum</i> sp.	83
5.7.1.2 <i>Cotylurus</i> sp.....	92
5.7.1.3 Crassiphialinae gen. sp.	93
5.7.1.4 Diplostomidae gen. sp.	94
5.7.1.5 <i>Hysteromorpha</i> sp.	95
5.7.1.6 <i>Tylodelphys</i> sp.	97

5.7.2 Trematódeos da Ordem Plagiorchiida.....	102
5.7.2.1 <i>Cyclocoelum mutabile</i>	102
5.7.2.2 <i>Typhlocoelum cucumerinum</i>	109
5.7.2.3 <i>Echinostoma</i> sp.....	114
5.7.2.4 <i>Fasciola hepatica</i> Linnaeus, 1758.....	119
5.7.2.5 <i>Philophthalmus gralli</i>	123
5.7.2.6 <i>Taxorchis</i> sp.	128
5.7.2.7 <i>Zygocotyle lunata</i>	133
5.7.2.8 <i>Hippocrepis hippocrepis</i> (Diesing, 1850)	140
5.8 Trematódeos identificados exclusivamente por morfologia.....	147
5.8.1 <i>Apharyngostrigea</i> sp.	147
5.8.2 <i>Centrocestus formosanus</i>	147
5.8.3 <i>Drepanocephalus</i> sp.....	149
5.8.4 <i>Renicola</i> sp.	150
5.8.5 Spirorchidae gen. sp.....	151
5.9 Trematódeo não identificado infectando anseriformes domésticos.....	153
5.10 Resumo das espécies estudadas quanto a identificação taxonômica e ciclo de vida	153
6. DISCUSSÃO	155
7. CONCLUSÕES	189
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	191
APÊNDICE 1	233
APÊNDICE 2	249

1. INTRODUÇÃO

O termo Parasitologia é utilizado para o estudo do fenômeno parasitismo, um tipo de associação interespecífica (SOULSBY, 1982). Este teve origem ao acaso, do simples contato de um organismo com outro, o último funcionando como um suporte, com relação primitivamente saprofítica ou livre (PESSÔA & MARTINS, 1982; GIBSON *et al.*, 2001). Ao longo do tempo, o hospedeiro passou a “alimentar” o hóspede, tendo vários níveis de especialização a determinado tipo de metabolismo e adaptação àquele meio, o que constituiu um fator importante para o desenvolvimento desse tipo de interação biológica (TRAVASSOS, 1950; PESSÔA & MARTINS, 1982; POULIN & CRIBB, 2002).

Durante muito tempo, o termo parasitismo foi utilizado equivocadamente para se referir a relação biológica estabelecida entre dois organismos que resulta em ação prejudicial sobre o hospedeiro (PESSÔA & MARTINS, 1982). Entretanto, com o avanço dos estudos dessas interações percebeu-se que associar estritamente a palavra parasitismo à doença não é condizente. De fato, muitos organismos não causam efeitos prejudiciais (em nível patológico e clínico) sobre seus hospedeiros. Em outros casos, tais efeitos são dependentes de vários fatores, como carga parasitária, virulência, idade e imunidade do hospedeiro (SOULSBY, 1982; PESSÔA & MARTINS, 1982; MOORE, 1987).

Nesse sentido, torna-se mais aceitável definir o termo parasitismo como um estado em que um organismo (o parasito) é metabolicamente dependente em maior ou menor grau ao hospedeiro (PÊSSOA & MARTINS, 1982; MOORE, 1987; SOULSBY, 1982; GÓMEZ & NICHOLS, 2013; JANOUSKOVEC & KEELING, 2016). Porém, há ainda na atualidade, confusão no uso dessas nomenclaturas, certamente devido à influência das associações ecológicas parasito-hospedeiro que resultam em doenças de importância médica ou veterinária, as quais despertam mais interesse, investimento e estudos (CUNHA, 1970; PESSÔA & MARTINS, 1982; BORAY, 2007; CHARLIER *et al.*, 2014; MEHMOOD *et al.*, 2017). Conseqüentemente, aspectos da biologia de muitos parasitos que aparentemente não causam danos severos aos hospedeiros vertebrados são negligenciados na literatura científica, embora estejam presentes em praticamente todos os ecossistemas (BROOKS, 2000; MOURITSEN & POULIN, 2005; POULIN, 2014). Todavia, muitas interações apresentam potencial de impactar direta ou indiretamente a relação entre trematódeos, ambiente e hospedeiros (ANDERSON, 1978; MOORE, 1987;

POULIN & MORAND, 2004; KOPRIVNIKAR *et al.*, 2012; POULIN, 2014; POULIN *et al.*, 2019). Como exemplo, existem modificações nas infecções por trematódeos em hospedeiros aquáticos devido a algum nível de instabilidade na homeostase do ecossistema, consequente a modificações, dentre estas, as climáticas e antropogênicas (ESCH *et al.*, 1986; MARCOGLIESE *et al.*, 1990, 2001). Além disso, ações não patológicas sobre os hospedeiros não são incomuns, mas podem afetar o comportamento, desenvolvimento, fecundidade, movimentação, predação e, conseqüentemente, regulação na população de hospedeiros, modificando a estrutura da comunidade e do habitat. Sendo assim, os trematódeos podem ser considerados agentes bioindicadores (ANDERSON, 1978; ESCH *et al.*, 2002; MARCOGLIESE, 2001; MARCOGLIESE, 2005; FLINK *et al.*, 2017; TAGLIORETTI *et al.*, 2018).

Dentre os diferentes grupos de helmintos parasitos, existem aqueles incluídos no filo Platyhelminthes Gegenbaur, 1859. Estes invertebrados são, em sua maioria, achatados dorsoventralmente, geralmente hermafroditas, sem cavidade corporal, com tubo digestório presente ou ausente, geralmente possuem simetria bilateral, sistema circulatório e respiratório ausentes, sistema excretor e osmorregulador do tipo protonefrídico caracterizado pela presença de células-flamas (TRAVASSOS, 1950; FREITAS, 1981). Os platelmintos considerados como parasitos obrigatórios (classes Cestoda, Monogenea e Trematoda) encontram-se alocados no subfilo Neodermata Ehlers, 1985, no qual, todos os representantes evoluíram com modificações estruturais de seu tegumento (neoderme) que proporcionaram sua sobrevivência e reprodução nos hospedeiros. (LITTLEWOOD *et al.*, 2001; CAIRA & LITTLEWOOD, 2013).

Ao longo do tempo, a estruturação das categorias taxonômicas superiores entre os platelmintos neodermatas vêm sofrendo mudanças, mais recentemente suportadas por estudos filogenéticos. Dentre estes, há o estudo de Ehlers (1985), baseado exclusivamente em aspectos morfológicos, sendo então proposto na época, que os monogeneicos e cestódeos formavam um grupo irmão, suportado pela presença em comum de estruturas de fixação rígidas. Já os trematódeos apresentavam-se como um grupo distinto se comparado aos dois primeiros por não apresentar tal similaridade [(Monogenea, Cestoda) Trematoda] (EHLERS, 1985, LITTLEWOOD *et al.*, 2001, CRIBB *et al.*, 2003). Mais recentemente, com os avanços nas pesquisas em biologia molecular, houve um novo rearranjo na classificação dos neodermatas, no qual, os monogeneicos se apresentam como um grupo isolado em relação aos cestódeos e trematódeos, sendo os dois últimos considerados como grupos irmãos [(Cestoda, Trematoda) Monogenea] (OLSON &

TKACH, 2005). Nesse aspecto, é importante mencionar que a atual organização taxonômica corrobora com características do ciclo biológico desses seres, pois os monogeneicos possuem ciclo direto e os trematódeos e cestódeos possuem ciclo indireto (CAIRA & LITTLEWOOD, 2013).

Dentre os neodermatas, a Classe Trematoda Rudolphi, 1808, se caracteriza por agrupar vermes geralmente hermafroditas, com corpo foliáceo, ovoide ou cilíndrico e sem segmentação; tegumento não ciliado no adulto; ventosas quase sempre presentes; sem sistema circulatório; canal alimentar presente e incompleto (TRAVASSOS, 1950; PESSÔA & MARTINS, 1982; SOULSBY, 1982). Nesta classe há atualmente duas subclasses: Aspidogastrea Faust & Tang, 1936 e Digenea Carus 1863, sendo nesta última incluídos os parasitos foco deste estudo.

Estudos de classificação filogenética decorrentes de análise de sequências de DNA ribossomal apontam que a subclasse Digenea é dividida em duas ordens: Diplostomida Olson, Cribb, Track, Bray & Littlewood, 2003, com uma subordem e três superfamílias, e Plagiorchiida La Rue, 1957, com 15 subordens e 21 superfamílias (OLSON *et al.*, 2003; PÉREZ-PONCE DE LEÓN & HERNÁNDEZ-MENA, 2019). Como características dos trematódeos dessa subclasse, a forma adulta, envolvida na reprodução sexuada, é encontrada em hospedeiros definitivos, que podem ser de diferentes táxons (aves, mamíferos, répteis, anfíbios e peixes). Já as formas larvais são encontradas em hospedeiros intermediários, obrigatoriamente um invertebrado, que na quase absoluta maioria das vezes trata-se de um molusco; em várias famílias há a necessidade de um segundo hospedeiro intermediário, podendo ser um vertebrado ou diferentes grupos de invertebrados, dependendo da espécie de parasito (CRIBB *et al.*, 2001; OLSON *et al.*, 2003; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003; POULIN & MORAND, 2004; OLSON & TKACH, 2005; GÓMEZ & NICHOLS, 2013). A participação de um terceiro hospedeiro intermediário ou de hospedeiros paratênicos também não é incomum entre os trematódeos, como, por exemplo, aqueles pertencentes à superfamília Diplostomoidea Poirier, 1886 (GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003; BLASCO-COSTA *et al.*, 2017).

1.1 Aspectos gerais sobre a biologia de trematódeos

Os trematódeos possuem ciclos biológicos do tipo digeneico ou heteróximo, ocorrendo em habitats aquáticos na maioria das famílias, mas com grupos mantidos em ambiente exclusivamente terrestres (TRAVASSOS, 1950; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). Nestes ciclos de reconhecida complexidade, verifica-se durante a vida destes helmintos parasitos, alternâncias entre hospedeiros invertebrados e vertebrados, fase de vida livre e parasitária e reprodução assexuada (hospedeiros intermediários) e sexuada (hospedeiros definitivos) (TRAVASSOS, 1950; CRIBB *et al.*, 2001; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003; GÓMEZ & NICHOLS, 2013). Além disso, nas distintas fases evolutivas destes parasitos, percebe-se grande variedade morfológica encontrada nas formas de vida livre e parasitária (TRAVASSOS, 1950; SOULSBY, 1982; POULIN & MORAND, 2004), sendo as principais generalidades dessas fases apresentadas a seguir.

1.1.1 Ovos e miracídios

Após a maturidade sexual e reprodução dos trematódeos adultos, há a produção de ovos, que possuem as mais variadas formas e tamanhos dependendo da espécie, características que podem ser utilizadas como auxílio na caracterização morfológica e diagnóstico (FREITAS, 1981; SOULSBY, 1982; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). No interior dos ovos há a formação de uma nova fase de vida: os miracídios. O desenvolvimento destes pode ocorrer de forma variada, dependendo da espécie. Entre as possibilidades existem (1) a formação larval ainda nas alças uterinas do trematódeo, como os membros da família Philophthalmidae Looss, 1899 (ALICATA, 1962); (2) o desenvolvimento, após ovipostura pelos parasitos adultos, nos tecidos do hospedeiro definitivo, como verificado nas espécies pertencentes à família Schistosomatidae Stiles & Hassal, 1898 (PELLEGRINO & FARIA, 1965; SOULSBY, 1982; HORÁK *et al.*, 2015); (3) a eliminação de ovos no ambiente com larvas imaturas, com desenvolvimento embrionário associado às condições do meio externo, como variáveis de temperatura e luminosidade, por exemplo, como ocorre em alguns membros da superfamília Paramphistomoidea Fischöder, 1901 (SOULSBY, 1982; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003) e, além desses, (4) aqueles trematódeos que possuem a manutenção de miracídios dentro da cápsula ovígera, com a eclosão larval

consequente à ingestão destas pelo molusco hospedeiro intermediário, como verificado em espécies pertencentes à superfamília Pronocephaloidea Looss, 1899, em meio aquático, ou aqueles pertencentes à família Dicrocoeliidae Looss, 1899, em meio terrestre (SOULSBY, 1982; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003, PINTO *et al.*, 2014).

Ao longo da história evolutiva das espécies com ciclo biológico aquático, foram desenvolvidos mecanismos para facilitar o encontro dos miracídios com o molusco hospedeiro intermediário. Entre estes, muitos miracídios têm predileção para determinado nível na coluna d'água que corresponde o local onde os hospedeiros intermediários moluscos habitam, além destas larvas de trematódeos apresentarem estruturas fotorreceptoras e sensores químicos, de forma a aumentar as chances de encontro do molusco no extenso ambiente aquático (ESCH *et al.*, 2002; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). Após a infecção do hospedeiro invertebrado, o estágio larval migra para um local específico (glândula digestiva ou manto), dependente de cada espécie, tendo posteriormente a possibilidade de desenvolvimento de duas formas evolutivas: esporocisto e/ou rédia (TRAVASSOS, 1950; PESSÔA & MARTINS, 1982; ESCH *et al.*, 2002; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003).

1.1.2 Esporocistos

Os esporocistos caracterizam-se por ser um saco germinativo amorfo, e têm por função a nutrição embrionária e reprodução assexuada, sendo a massa germinativa a principal estrutura responsável por esse processo, que pode desencadear, simplificadamente, em três estádios: nova geração de esporocistos, rédias ou cercárias. Essa fase evolutiva é caracterizada pela ausência de tubo digestório, sendo a nutrição realizada exclusivamente por absorção tegumentar de nutrientes presentes na hemolinfa do molusco (CHENG *et al.*, 1973; PESSÔA & MARTINS, 1982; ESCH *et al.*, 2002; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). Para o sucesso da reprodução, mecanismos de interação com o meio podem ser empregados consequente a resposta imune do molusco ou demanda energética, como por exemplo, o processo de castração parasitária do hospedeiro invertebrado (CHENG *et al.*, 1973; SULLIVAN *et al.*, 1985; MOORE, 1987). Dessa forma, o sucesso reprodutivo da fase intramolusco é dependente do equilíbrio na relação parasito-hospedeiro. Entretanto, esse equilíbrio sofre extensa variabilidade entre os trematódeos digenéticos, dependendo de mudanças intraespecíficas no processo de infecção, intensidade de infecção, intensidade de germinação de células

indiferenciadas e demanda energética nas fases germinativas que podem levar até a morte os moluscos infectados em diferentes taxas e etapas da infecção (GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003; UETA, 1980).

1.1.3 Rédias

Outra forma evolutiva presente em várias famílias de trematódeos digeneicos são as rédias, as quais, possuem basicamente as mesmas funcionalidades que os esporocistos. Contudo, são caracterizadas pela presença de boca, faringe e intestino rudimentar, além de poderem ou não apresentar apêndices locomotores (KANEV *et al.*, 1993; ESCH *et al.*, 2002; JOHNSON & SUTHERLAND, 2003; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). Esses organismos possuem atividade locomotora, assim como a capacidade de ingestão direta do tecido do hospedeiro molusco, o que pode estar relacionado a um efeito patogênico mais acentuado nestes hospedeiros, principalmente quando os parasitos ainda estão jovens e mais ativos (ESCH *et al.*, 2002; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). É interessante mencionar, que por se alimentarem, as rédias podem ser seletivas quanto à ingestão de rédias e outras formas larvais de outras espécies de trematódeos quando se trata de coinfeção (ESCH *et al.*, 2002). Após essa fase, as rédias aumentam de tamanho, assumem formato sacular e perdem a capacidade locomotora, mantendo sua contratilidade e otimizando absorção de nutrientes tanto pelo aparato bucal, quanto pelo tegumento em contato com a hemolinfa do molusco (GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). A ocorrência de castração do molusco devido a processos inflamatórios e de demanda energética pode ser verificada durante a infecção (SULLIVAN *et al.*, 1985).

Além disso, formas parasitárias intra hospedeiro invertebrado desenvolveram mecanismos de adaptação para evitar, resistirem e até modificarem as defesas imunitárias do molusco infectado (GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). Não obstante, algumas espécies também modificam seu metabolismo de acordo com a sazonalidade, quando o ambiente estará mais propício ao potencial biótico do trematódeo. No curso evolutivo dos trematódeos digeneicos, porém, algumas fases podem estar suprimidas (TRAVASSOS, 1950; CRIBB *et al.*, 2001).

No decorrer da infecção, as rédias podem dar origem a outras formas semelhantes (rédias filhas e/ou netas) ou gerarem em seu interior as cercárias (TRAVASSOS, 1950; KANEV *et al.*, 1993; JOHNSON & SUTHERLAND, 2003).

1.1.4 Cercárias

Seguindo a fase de desenvolvimento intramolusco, os esporocistos ou as rédias dão origem às cercárias, uma forma livre na maioria dos trematódeos digeneicos (TRAVASSOS, 1950; PESSÔA & MARTINS, 1982; CRIBB *et al.*, 2001). Essa forma evolutiva é extremamente variável, possuindo morfologia, biologia e comportamento bem distintos entre os trematódeos (GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003; PINTO & MELO, 2013 ab). A função primordial é a dispersão e consequente infecção do próximo hospedeiro envolvido no ciclo biológico: o hospedeiro definitivo ou o segundo hospedeiro intermediário (TRAVASSOS, 1950; CRIBB *et al.*, 2001; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). Dependente da espécie de trematódeo, as cercárias liberadas variam desde a poucas unidades a milhões, por período que varia tanto a poucos dias quanto a anos (ESCH *et al.*, 2002).

No geral, o corpo das cercárias é dividido em duas porções: o corpo e a cauda. Basicamente, o corpo geralmente tem formato oval a alongado, apresenta ventosas e cecos, em alguns casos células cistogênicas, glândulas de penetração, faringe, esôfago, aparelho excretor, além de estruturas acessórias como estilete e colar de espinhos. A cauda pode apresentar-se de formato simples ou com furcas, podendo ser longas ou curtas, além da observação de estruturas como membranas natatórias, pêlos sensoriais e espinhos (LUTZ, 1924; RUIZ, 1943; PINTO & MELO, 2013a). O aparelho excretor apresenta pares de células flamas e as cercárias também podem apresentar órgãos pigmentados sensíveis à luz denominados ocelos (TRAVASSOS, 1950; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1981; PESSÔA & MARTINS, 1982; PINTO & MELO, 2010; PINTO & MELO, 2013a; SHCHENKOV *et al.*, 2019). Devido a essas características, as cercárias podem ser classificadas em vários tipos de acordo com suas peculiaridades. Esses tipos baseiam-se, a princípio, na presença ou ausência de cauda, número e posição de ventosas no corpo, a forma e o tamanho relativo da cauda, como presença de furcas (brevifurcadas- furcas menores que a metade do tronco caudal, longifurcadas- furcas maiores que a metade do tronco caudal) e mais especificamente na morfologia e morfometria de caracteres estruturais mais complexos, como por exemplo, glândulas de penetração, ocelos e número de espinhos no colar cefálico (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1981; FREITAS, 1982; NASIR & SCORZA, 1966; PINTO & MELO, 2013a; PINTO *et al.*, 2017; SHCHENKOV *et al.*, 2019). Como exemplo, cercárias do tipo xifidiocercária possuem uma estrutura de perfuração denominada estilete na porção anterior do corpo (OSTROWSKI DE NÚÑEZ,

1981; BESPROZVANNYKH *et al.*, 2013; KUDLAI *et al.*, 2015; SHCHENKOV *et al.*, 2019), já cercárias do tipo Equinostoma possuem uma coroa de espinhos em volta da ventosa oral (KANEV *et al.*, 1993; PINTO & MELO, 2013ab; GEORGIEVA *et al.*, 2012) e cercárias do tipo Anfistoma possuem ventosa oral na extremidade anterior, enquanto a ventosa ventral opõem-se localizada na extremidade posterior do corpo, além da presença manchas oclares (OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.*, 2011; PINTO & MELO, 2013a). Salienta-se, que as cercárias não se alimentam e que por este motivo geralmente têm pouco tempo de vida, dentro de horas a poucos dias (ESCH *et al.*, 2002; PINTO & MELO, 2013a).

A partir do momento em que as cercárias alcançam o meio externo (aquelas que possuem fase de vida livre), suas características morfológicas desempenham funções com o intuito do encontro e infecção do próximo hospedeiro, sendo este processo realizado de forma coordenada com o ambiente externo, com influências de variáveis como luminosidade, gravidade e turbulência, assim como substâncias físico-químicas presentes no ambiente, algumas vezes, provenientes do segundo hospedeiro intermediário, quando este faz parte do ciclo (ESCH *et al.*, 2002; GALAKTIONOV & DOBROVLSKIJ, 2003).

Há cinco tipos principais de cercárias quanto à sua biologia: (1) aquelas que pertencem a trematódeos com ciclo de vida mais simples, geralmente com apenas dois hospedeiros, em que a cercária de vida livre pode ser ingerida (p.ex. em algumas espécies de trematódeos marinhos das famílias Bivesiculidae e Azygiidae) ou penetrar no tegumento do hospedeiro vertebrado como na família Schistosomatidae (CUNHA, 1970; PINTO *et al.*, 2017); (2) as que se encistam em meio externo assumindo a forma de metacercária como as pertencentes às famílias Fasciolidae, Philophthalmidae e Paramphistomidae (KANEV *et al.*, 1993; NOLLEN & KANEV, 1995; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1976; GALAKTIONOV & DOBROVLSKIJ, 2003; BORAY, 2007); (3) as que necessitam encontrar um segundo hospedeiro intermediário para se desenvolverem em metacercárias, como nos representantes da superfamília Diplostomoidea (JOHNSON & SUTHERLAND, 2003; BLASCO-COSTA E LOCKE, 2017; LÓPEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2019); (4) cercárias que perderam a capacidade de locomoção ambiental e penetração nos hospedeiros, tornando-se metacercárias no interior do molusco, como verificado em espécies das famílias Leucochiliriidae e Cyclocoelidae (SCHAFRANSKI, 1974) e (5) aquelas cercárias que no meio externo necessitam ser ingeridas por um

segundo hospedeiro intermediário, como membros da família Dicrocoelidae (SOULSBY, 1982; PINTO *et al.*, 2014).

Essa fase evolutiva possui grande importância para o estudo da biologia de trematódeos digeneicos, assim como muitos trabalhos científicos ainda têm como base essa fase de vida. Além disso, nos primeiros estudos zoológicos, quando não se conhecia bem os ciclos de vida dos trematódeos, as cercárias eram estudadas como uma fase evolutiva já completa e com nomenclatura própria (PIRAJÁ DA SILVA, 1912; NASIR, 1962; NASIR & SCORZA, 1966; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1981). Quanto à biologia, posteriormente, cercárias de várias espécies de trematódeos podem se desenvolver em metacercárias.

1.1.5 Metacercárias

A fase de metacercária é uma interface entre a forma cercariana e o parasito adulto, diferindo-se na maioria das espécies apenas pelo desenvolvimento dos órgãos reprodutivos, estando imaturos na fase larval e já desenvolvidos na fase adulta (TRAVASSOS, 1950; ESCH *et al.*, 2002; GALAKTIONOV & DOBROVLSKIJ, 2003). Em alguns trabalhos, há a distinção na nomenclatura dessas formas infectantes. Essa fase de vida do trematódeo digeneico pode assumir dois aspectos de transmissão como método de otimizar as chances de infecção no hospedeiro definitivo. O primeiro, utiliza apenas um hospedeiro intermediário invertebrado e o hospedeiro vertebrado que se infecta passivamente por ingestão dessas formas infectantes. Esse processo se dá pela presença de células cistogênicas presentes nas cercárias que são secretadas no momento de adesão do organismo pela ventosa em substratos, ou até mesmo, na lâmina d'água (BORAY, 1978; BORAY, 2007; PINTO & MELO, 2010; MAS-COMA *et al.*, 2018). Neste caso, o encistamento tem por função a utilização econômica de energia, proteção da forma infectante no interior da cápsula às adversidades ambientais e maior tempo de viabilidade no ambiente. Estes fatores podem aumentar as chances de infecção do hospedeiro vertebrado e conseqüentemente de dispersão do parasito (GALAKTIONOV & DOBROVLSKIJ, 2003).

No segundo aspecto, há a participação de dois ou mais hospedeiros intermediários, sendo o primeiro um molusco e os outros são determinados por uma grande variedade de organismos, como outro molusco, planárias, insetos, peixes, anfíbios, répteis, onde a motilidade do hospedeiro compensa a imobilidade ambiental da larva, além de oferecer

proteção, menos gasto de energia e, conseqüentemente, maiores chances de sucesso no encontro do hospedeiro definitivo predador (CRIBB *et al.*, 2001; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003;). Enfatiza-se, que em alguns casos, as metacercárias apresentam a morfologia muito próxima aos adultos diferenciando no grau de desenvolvimento dos órgãos sexuais ainda em processo de maturação, tornando-se também importantes para o estudo taxonômico (CAFFARA *et al.*, 2017; SERENO-URIBE *et al.*, 2018).

1.1.6 Trematódeo digeneico adulto

Todas essas transformações sofridas no decorrer do desenvolvimento dos trematódeos até o momento têm como objetivo principal a perpetuação da espécie com fases livres e parasitárias conseqüente ao processo de reprodução (TRAVASSOS, 1950; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). No hospedeiro vertebrado definitivo, há intensas transformações funcionais e morfológicas do parasito com adaptações ao novo ambiente da vida parasitária, com a concretização da maturidade sexual para realização da reprodução sexuada, que pode ser obtida tanto por fecundação cruzada quanto por autofecundação (este último exceto para trematódeos com dimorfismo sexual, como verificado na família Schistosomatidae Stiles & Hassall, 1898). Como resultado da reprodução dos parasitos nos hospedeiros definitivos, há liberação de ovos férteis para início de um novo ciclo (TRAVASSOS, 1950; SOULSBY, 1982).

Os trematódeos digeneicos apresentam uma grande diversidade de sítios de infecção nos tecidos dos hospedeiros definitivos, desde os seios nasais, conjuntiva palpebral, traqueia, ductos biliares, ductos pancreáticos, sacos aéreos, pulmões, vasos mesentéricos, até o mais comum, o tubo digestório (TRAVASSOS, 1950; FREITAS, 1981; SOULSBY, 1982). Para o sucesso da infecção, os trematódeos necessitam superar barreiras e adaptarem-se ao meio, desenvolvendo distintos processos de escape ao longo da evolução, de forma a permitir a sobrevivência no organismo vertebrado, sendo esse estruturalmente mais organizado, comparado aos hospedeiros invertebrados (PESSÔA & MARTINS, 1982). Dessa forma, a fase parasitária adulta dos trematódeos desenvolveu adaptações para sobreviver no hospedeiro vertebrado definitivo, gerar aporte energético, realizar a reprodução e tentar manter em variáveis graus, o equilíbrio na relação parasito-hospedeiro (ANDERSON, 1978; PESSÔA & MARTINS, 1982).

Ressalta-se, que o trematódeo adulto é a fase evolutiva mais determinante e imprescindível para a taxonomia do grupo. Neste estágio, os órgãos já estão completamente desenvolvidos, sendo possível a diferenciação e comparação mais efetiva e segura entre os táxons (KOHN & PEREIRA, 1970; GIBSON *et al.*, 2002). Além disso, para a medicina humana e veterinária, parasitos adultos tem importância substancial na causa de várias doenças que podem resultar em impactos sociais e econômicos (BORAY, 2007; CUNHA, 1970; PESSÔA & MARTINS, 1982; SOULSBY, 1982; MEHMOOD *et al.*, 2017).

1.2 Interações entre trematódeos, hospedeiros, ambiente e seus impactos

Como característica do processo adaptativo, os trematódeos em sua maioria possuem maior especificidade em relação aos moluscos se comparados aos hospedeiros definitivos (GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003; TORCHIN *et al.*, 2005; ADEMA & LOKER, 2015). Em relação aos vertebrados, existem espécies que apresentam potencial patogênico, o que pode desencadear processos patológicos em distintas espécies hospedeiras (como os humanos), as epidemiologicamente denominadas *Zoonoses*. Esse termo foi genericamente utilizado pela *World Health Organization* (WHO) em 1959, para definir doenças e infecções naturalmente transmitidas entre animais e humanos. Entretanto, em 1960, o uso do termo foi atualizado para designar a transmissão de patógenos que infectam hospedeiros naturais (hospedeiros reservatórios) para outros hospedeiros (hospedeiros acidentais) (NELSON, 1960).

De fato, atualmente se destaca o termo *One health*, adotado por organizações internacionais como a *World Health Organization* e a *World Organization for Animal Health*, que possuem como conceito de saúde a interconectividade entre componentes humanos, animais e meio ambiente (WHO, 2006; KARESH *et al.*, 2012; SCHURER *et al.*, 2016). Nesse sentido, sabe-se que 60% das doenças infecciosas humanas têm como característica patógenos que infectam animais domésticos e silvestres (KARESH *et al.*, 2012). Dentre eles, encontram-se os trematódeos digenéticos, sendo transmitidos de forma direta pelo contato com fases infectantes ou indireta, pela ingestão de hospedeiros intermediários infectados, como peixes consumidos *in natura* ou malcozidos (WHO, 2005; CHAI *et al.*, 2005; WHO, 2006; WAIKAGUL *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2013; MASCOMA *et al.*, 2018; PULIDO-MURILLO *et al.*, 2018).

Ainda no contexto sobre *One health*, a dispersão de parasitos sofre forte influência de fatores ecológicos, como maior exposição e contato entre animais silvestres, animais domésticos e humanos em determinado ambiente, desencadeando maior risco de infecção por agentes com potencial patogênico, predispondo à ocorrência e disseminação de zoonoses, fenômeno denominado *spillover* (KARESH *et al.*, 2012; PLOWRIGHT *et al.*, 2017). Na atualidade, muitas doenças zoonóticas emergentes surgem a partir do desequilíbrio ecológico (como mudanças climáticas, desmatamento), comportamento humano (urbanização, migração, consumo de alimentos, processos culturais) e interferência nas formas de vida e produção animal como, por exemplo, intensificação de criações, aglomeração e transporte de animais domésticos, translocação da vida silvestre e aproximação de animais selvagens a áreas urbanas devido às modificações ou destruição do *habitat* natural (KARESH *et al.*, 2012; THOMPSON & POLLEY, 2014; SCHURER *et al.*, 2016).

Todavia, os trematódeos mais abordados na literatura científica e que despertam maior interesse por estudos, são aqueles com potencial patogênico e/ou zoonótico (POULIN, 2014; BLASCO-COSTA & POULIN, 2017). Como exemplo, citaremos dois digeneicos muito estudados na medicina humana e animal. O primeiro, *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, tem por característica a infecção ativa por penetração da forma cercariana, sendo o agente causador da esquistossomose mansoni, doença tida como natural de humanos, presente em vários países, de caráter intercontinental, principalmente aqueles subdesenvolvidos e com sanidade precária, sendo que esse agente também tem potencial de infecção em várias espécies animais, como primatas não humanos (FENWICK, 1969), roedores (D'ANDREA *et al.*, 2000) e, até mesmo, bovinos (MODENA *et al.*, 1993), podendo ser então categorizada como uma *zooantroponose* (NELSON, 1960). Devido à sua importância na medicina humana, existe vasta literatura sobre a biologia de *S. mansoni*, assim como a epidemiologia, patologia, prevenção, controle e tratamento da esquistossomose (LUTZ, 1919; CUNHA, 1970; CARVALHO *et al.*, 2008; HAMS *et al.*, 2013; CHUAH *et al.*, 2014; INOBAYA *et al.*, 2014). Como nota, é importante ressaltar que no continente americano existem naturalmente moluscos transmissores de *S. mansoni*, sendo pertencentes ao gênero *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) e amplamente distribuídos pelo Brasil, com atualmente 11 espécies e uma subespécie descritas (CARVALHO *et al.*, 2018). Destas, três espécies são consideradas hospedeiras naturais de *S. mansoni*: *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835) e *B. straminea* (Dunker, 1848) (PARAENSE, 1970). No contexto histórico, a

presença no país de planorbídeos susceptíveis à infecção por este agente propiciou a instalação e disseminação do esquistossomatídeo invasor em território nacional a partir do tráfico de escravos infectados provenientes do continente africano (PIRAJÁ DA SILVA, 1912), tornando-se ao longo dos anos uma zoonose de grande impacto para a saúde humana no país, assim como já ocorria em outras regiões do globo (CUNHA, 1970; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; CARVALHO *et al.*, 2018).

Outro trematódeo extremamente estudado, com ampla literatura disponível denomina-se *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, que infecta passivamente animais herbívoros por ingestão de metacercárias encistadas na vegetação, causando a doença fasciolose, responsável por grandes prejuízos à produção animal, como na bovinocultura e ovinocultura, sendo também uma enfermidade de caráter intercontinental, com transmissão acidental para outros mamíferos domesticados, silvestres e seres humanos devido à ingestão de alimentos *in natura* contaminados (AMARAL & BUSETTI, 1979; UETA, 1980; SILVA-SANTOS *et al.*, 1992; SANTARÉM *et al.*, 2006; BORAY, 2007; LIU *et al.*, 2008; MAS-COMA *et al.*, 2009; CHARLIER *et al.*, 2014; MEHMOOD *et al.*, 2017). A fasciolose é considerada então uma *antropozoonose* (NELSON, 1960). Como nota, sabe-se que moluscos limneídeos são responsáveis pela transmissão de *F. hepatica*, sendo considerado um helminto com distribuição cosmopolita (BORAY, 1978; SANTARÉM *et al.*, 2006; MAS-COMA *et al.*, 2009; MEDEIROS *et al.*, 2014; MAS-COMA *et al.*, 2018). Atualmente a fasciolose encontra-se em expansão pelo país com relatos tanto em animais domésticos e silvestres, quanto em humanos (AMARAL & BUSETTI, 1979; SERRA-FREIRE & NUERNBERG, 1992; IGREJA *et al.*, 2004; LIMA *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2014).

Entretanto, é importante mencionar que o impacto causado pelos parasitos aos hospedeiros e sobre a biodiversidade não se restringe apenas ao adoecimento, mas, muitas vezes, ao demandar recursos metabólicos e energéticos, comportamentais e fisiológicos, como mudança na alimentação, predação, reprodução e mecanismos de fuga (KOPRIVNIKAR *et al.*, 2012; JOHNSON & SUTHERLAND, 2003; POULIN & MORAND, 2004; SEPPÄLÄ *et al.*, 2011; GÓMEZ & NICHOLS, 2013; SANTOS & SANTOS, 2013). Além disso, alterações na dinâmica parasito-hospedeiro decorrentes de modificações ambientais (KOPRIVNIKAR *et al.*, 2012). Como exemplo, alguns membros da família Diplostomidae Poirier, 1886, têm como sítio de infecção em sua fase larval, olhos e cérebros de peixes (segundo hospedeiro intermediário). Resumidamente, as cercárias após emergirem do molusco penetram nos tecidos do peixe e migram para

esse sítio de infecção. Consequentemente, podem haver prejuízos à visão do animal e, assim, dificultar o processo de fuga em momentos de predação, o que facilitaria a ingestão do peixe infectado por uma ave e, por sua vez, a ocorrência do desenvolvimento da fase adulta no hospedeiro definitivo, perpetuando o ciclo de vida do digeneico (SEPPÄLÄ *et al.*, 2006, 2011; FLINK *et al.*, 2017). Outra enfermidade, a “doença dos pontos pretos” é decorrente da infecção por metacercárias causada, por exemplo, por diplostomídeos pertencentes ao gênero *Austrodiplostomum*, *Uvulifer* e *Posthodiplostomum* e pode, além de afetar visualmente o tegumento dos peixes hospedeiros, retardar o desenvolvimento e a longevidade dos vertebrados acometidos (LEMLY & ESCH, 1985; ESCHER, 2002; TAKEMOTO *et al.*, 2004). Ressalta-se, que as mudanças comportamentais dos hospedeiros, assim como sua intensidade depende de vários fatores, dentre eles, o estágio de desenvolvimento do trematódeo e carga parasitária (PENNYCUICK, 1971; MARCOGLIESE, 2004; SANTOS & SANTOS, 2013).

Trematódeos também podem servir como bioindicadores ambientais, uma vez que estes exercem estrita relação com o meio que se inserem, assim como com seus hospedeiros, sendo que modificações podem determinar a desestabilização em um microecossistema, sendo refletido na fauna de trematódeos, como por exemplo, em processos de assoreamento e eutrofização, afetando a presença de hospedeiros susceptíveis e, consequentemente nas fauna de trematódeos ali ocorrentes (ESCH *et al.*, 1986; MARCOGLIESE *et al.*, 1990), assim como também pelo fenômeno de “castração parasitária” de agentes transmissores (moluscos) (CHENG *et al.*, 1973; LAFFERTY & MORRIS, 1996; MARCOGLIESE, 2004; LAFFERTY & KURIS, 2009), ou pela competição de uma determinada espécie de trematódeo sobre outra, como, por exemplo, infecções por espécies que têm reflexo negativo à infecção por *S. mansoni* em moluscos (BASCH *et al.*, 1969; LAIDEMITT *et al.*, 2019) e nos hospedeiros definitivos (ANDERSON, 1978; MALDONADO-JÚNIOR *et al.*, 2001).

1.3 O conhecimento sobre a biodiversidade de trematódeos digeneicos

Atualmente, a nível mundial, estima-se que os trematódeos digeneicos compreendem aproximadamente 150 famílias, 2700 gêneros e 18000 espécies nominais (CRIBB *et al.*, 2001; CRIBB *et al.*, 2003). Entretanto, o ciclo biológico parcial ou completo foi elucidado apenas para cerca de 1.500 espécies, incluindo muitas cercárias que ainda não foram associadas às suas formas adultas (CRIBB *et al.*, 2003; LÓPEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2019).

No Brasil, mais de 750 espécies de trematódeos foram registradas em hospedeiros definitivos (COHEN *et al.*, 2020). Contudo, até o ano de 2013 foram identificadas apenas 46 espécies de trematódeos (23 famílias e 35 gêneros) e infectando 25 espécies de moluscos. Dentre esses, 33 espécies infectam moluscos de água doce, 5 infectam moluscos terrestres e 7 espécies infectam moluscos marinhos, porém, poucos possuem poucas informações a nível molecular (PINTO & MELO 2013ab; PINTO *et al.*, 2016; LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2018; 2019, LOPES *et al.*, 2020).

Além dos entraves gerados pela restrição do foco de estudos em trematódeos que apresentam potencial patológico, outro fato sobre o escasso conhecimento na sistemática de trematódeos está relacionado à centralização dos estudos, que concentram-se onde existem maior número de pesquisadores especializados e investimentos na área, estando em sua maioria nas regiões temperadas do globo, onde localizam-se grande parte dos países desenvolvidos e com maior capital para investimento em pesquisas sobre biodiversidade. Conseqüentemente, há uma lacuna no conhecimento desses helmintos na região com maior variedade de habitats e concentração de seres vivos do planeta – a zona tropical- (CRIBB *et al.*, 2001; POULIN, 2014; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017; POULIN *et al.*, 2020).

1.3 Abordagens utilizadas no estudo dos trematódeos

1.3.1 Estudos tradicionais

Existem muitos métodos de pesquisa para o conhecimento da sistemática dos trematódeos. Dentre as técnicas clássicas utilizadas, a primeira a ser empregada é a morfologia e morfometria, sendo imprescindíveis na descrição das espécies e compõem as mais diversas chaves de identificação, além do suporte obtido pelo estudo de listagens de espécies, informações sobre hospedeiros e distribuição geográfica (YAMAGUTI, 1975; GIBSON *et al.*, 2002; NOLAN & CRIBB, 2005; PINTO & MELO, 2013ab; FERNANDES *et al.*, 2015). Entretanto, também existem muitas dificuldades, principalmente na distinção de espécies próximas, como exemplo, as variações advindas das técnicas utilizadas para obtenção, fixação, coloração e montagem dos parasitos (TRAVASSOS, 1950; PESSÔA & MARTINS, 1982), além de escassez e validade de caracteres morfológicos que podem causar certa discordância entre os especialistas na determinação taxonômica (MALDONADO-JÚNIOR *et al.*, 2001; NOLAN & CRIBB, 2005; NADLER & PÉREZ-PONCE DE LEÓN, 2011). Além disso, diferenças morfológicas advindas da idade do parasito, tipo e susceptibilidade de hospedeiros, assim como métodos de análise e conexão das informações do organismo podem afetar a descrição e especificação fidedignas (NOLAN & CRIBB, 2005).

Sabe-se também que a morfologia dos trematódeos digeneicos é muito variável, pois as fases imaturas, como miracídio, fases intramolusco e cercárias são bem distintas do parasito adulto, a última determinante e imprescindível para a descrição específica (ALICATA, 1962; NASIR 1962; BASCH, 1969; YAMAGUTI, 1975; GIBSON *et al.*, 2002). Por isso, o estudo de cercárias foi por muito tempo realizado separadamente das outras fases evolutivas, primeiramente por se acreditar que esse organismo era conservado morfológicamente, tendo até na atualidade nomenclatura própria, o gênero “*Cercaria*” Müller, 1773 (PIRAJÁ DA SILVA, 1912; LUTZ, 1919; RUIZ, 1943; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1981; PINTO & MELO, 2013a; SHCHENKOV *et al.*, 2019). Devido a isso, em muitas publicações especializadas no estudo de larvas de trematódeos, o nome científico dado a essa forma se distingue muitas vezes daquele utilizado para denominar a mesma espécie em sua forma adulta (NASIR, 1962; PINTO & MELO, 2010; SHCHENKOV *et al.*, 2019).

Portanto, para estudar a biologia dos trematódeos digeneicos em determinada localidade, é imprescindível também observar o modo de vida dos seus possíveis hospedeiros, o modo como esses interferem na dinâmica parasitária em um determinado ecossistema e na conexão correta das informações (CRIBB *et al.*, 2001; 2002). Porém, o estudo sobre um determinado ciclo biológico é oneroso, visto que envolve na pesquisa, o encontro e a associação entre os estágios evolutivos do parasito em diferentes hospedeiros intermediários e definitivos susceptíveis (invertebrados e vertebrados) (LUTZ, 1919; ALICATA, 1962; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1976; MALDONADO-JÚNIOR *et al.* 2001, PINTO & MELO, 2010).

Nesse contexto, a abordagem tradicional amplamente utilizada que possibilita o estudo da biologia de trematódeos é a infecção experimental, que permite além da morfologia, a obtenção de informações sobre a relação parasito-hospedeiro em laboratório (UETA, 1980; BLAIR & ISLAM, 1983; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1976; ISMAIL & ISSA, 1987; PINTO *et al.*, 2018). A taxonomia com estudo experimental pode ter três direcionamentos, sendo: (1) a partir de formas imaturas provenientes de hospedeiros intermediários (cercárias e metacercárias) utilizadas posteriormente na infecção de espécies vertebradas (LUTZ, 1919; NASIR, 1962; PINTO & MELO 2010; PINTO, 2013); (2) baseada no encontro do digeneico adulto no hospedeiro definitivo com obtenção de ovos e infecção de espécies de moluscos por miracídios e de hospedeiros secundários por cercárias, respectivamente (LUTZ, 1919; SCHAFRANSKI, 1974; PINTO *et al.*, 2018) e; (3) pela técnica ainda pouco abordada na atualidade, que consiste no cultivo *in vitro* de parasitos, sendo utilizado na taxonomia principalmente para obtenção da fase adulta a partir de formas imaturas obtidas de hospedeiros intermediários (VOGE & JEONG, 1971; FRIED & STABLEFORD, 1991; BLASCO-COSTA *et al.*, 2019). Entretanto, essas ferramentas experimentais, ainda que de grande valia, tem suas limitações, como manutenção e susceptibilidade de moluscos em laboratório, obtenção correta de fases imaturas, infecção e susceptibilidade dos hospedeiros vertebrados e infraestrutura e mão de obra especializada na manutenção de um local para esse fim (UETA, 1980; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1976; PINTO, 2013).

Como demonstração da complexidade sobre o estudo da sistemática de trematódeos, assim como a aplicação das técnicas abordadas, em 1902, Pirajá da Silva, então médico brasileiro, encontrou com frequência ao examinar amostras de fezes e até mesmo sangue venoso de enfermos internados no estado da Bahia, ovos com a presença de um espículo lateral, mas naquele momento não se esclareceu as origens e seis anos depois, em 1908,

publicou sobre a ocorrência da espécie *S. mansoni* no Brasil, com inferência a entrada do trematódeo no país relacionado ao tráfico de humanos escravizados infectados, provenientes de países africanos no período da colonização exploratória portuguesa. Já em 1912, Pirajá da Silva também publicou sobre o encontro de uma cercaria com cauda bifurcada (“*Cercaria blanchardi*”) procedente de um molusco planorbídeo, porém, na época, não se associou a forma imatura à adulta de *S. mansoni*, sendo o ciclo esclarecido pouco tempo mais tarde pelo então pesquisador Adolfo Lutz em 1919, após profundos estudos em moluscos e hospedeiros vertebrados, além de importantes observações sobre a dinâmica de infecção e patologia do agente (LUTZ, 1919; PESSÔA & MARTINS, 1982).

1.3.2 *Biologia molecular*

Atualmente, ferramentas e metodologias envolvendo a biologia molecular, como obtenção e análise de sequências genéticas têm sido consideradas um avanço na somatória do conhecimento biológico e taxonômico de trematódeos. Além disso, metodologias que envolvem sua utilização é cada vez mais aplicada no diagnóstico e epidemiologia das doenças causadas pelos mesmos, pois há possibilidade da associação das pesquisas relacionadas a esses platelmintos em distintos hospedeiros e *habitats* independente da sua forma evolutiva, por vários estudiosos nas mais distantes áreas geográficas (NOLAN & CRIBB, 2005; CRISCIONE *et al.*, 2005; MAS-COMA *et al.*, 2009; LOCKE *et al.*, 2011; HERNANDEZ-MENA *et al.*, 2014; SOLDÁNOVÁ *et al.*, 2017; PINTO *et al.*, 2016; LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2018). Não obstante, são utilizados marcadores moleculares para inferências filogenéticas, sendo atualmente aqueles presentes no DNA ribossomal (rDNA) e DNA mitocondrial (mtDNA) considerados ideais e utilizados para o estudo da sistemática de trematódeos (NOLAN & CRIBB, 2005; BLASCO-COSTA *et al.*, 2016).

O rDNA é composto por regiões transcritas, não transcritas e regiões intergênicas espaçadoras, com características de taxas de evolução altamente conservadas a regiões relativamente variáveis (HILLIS & DIXON, 1991; BLASCO-COSTA *et al.*, 2016). As regiões mais conservadas do rDNA são compostas por 2 subunidades, sendo a menor subunidade do rDNA denominada 18S (*Small Subunit- SSU*) e está entre as sequências com taxa de evolução mais lenta (HILLIS & DAVIS, 1986; NOLAN & CRIBB, 2005). Já a subunidade 28S (*Large Subunit- LSU*) é a maior subunidade do rDNA e demonstra

uma taxa evolutiva mais recente se comparada a anterior, porém, tanto 18S quanto 28S são consideradas regiões genéticas conservadas (HILLIS & DIXON, 1991). Além desses, há ainda a região *Internal Transcribed Spacer* (ITS), sendo atualmente amplamente utilizada no estudo de trematódeos digeneicos (NOLAN & CRIBB, 2005; BLASCO-COSTA *et al.*, 2016). Esse espaçador é subdividido em ITS1 e ITS2, interligados pelo gene 5.8Ss rRNA (esse último possui níveis de conservação gênica próximos ao 18S, porém, sua região é considerada curta para inferir com efetividade as filogenias complexas) (NOLAN & CRIBB, 2005). Ambas as regiões internas espaçadoras ITS1 e ITS2 permitem a caracterização de trematódeos digeneicos em distintos níveis taxonômicos. O ITS1 considerado mais variável que ITS2 e, na pesquisa filogenética, esses marcadores são apontados evolutivamente variáveis em comprimento a nível de família, ordem e níveis taxonômicos mais elevados e conservados a nível de gênero e espécies, sendo então possível distinguir espécies relacionadas filogeneticamente, porém, com restrições em análises intraespecíficas devido ao seu grau de conservação (NOLAN & CRIBB, 2005; MOSZCZYNSKA *et al.*, 2009; BLASCO-COSTA *et al.*, 2016). No estudo de digeneicos, em relação às inferências filogenéticas, geralmente os alinhamentos apresentam-se ambíguos quando as sequências emparelhadas diferem em mais de 30% em qualquer região e, dessa forma, as regiões de DNA aptas a tais estudos teoricamente são aquelas que apresentam similaridades maior que 70% e menor que 100% (HILLIS & DIXON, 1991).

Já o mtDNA é uma molécula presente nas mitocôndrias de metazoários, com forma circular e fechada em sua grande maioria (BOORE, 1999, LE *et al.*, 2002), onde encontra-se o genoma extracromossômico, sendo o mesmo pequeno, contendo aproximadamente 37 genes, sendo 2 para rRNA (RNA ribossomal), 12 ou 13 para proteínas e 22 para tRNA (RNA transportador) (LE *et al.*, 2002). Com isso, os produtos desses genes, juntamente com RNAs e proteínas importadas do citoplasma compõem em parte as mitocôndrias com sistemas de replicação de DNA, transcrição, processamento de mRNA e tradução de proteínas. Geralmente as sequências de mtDNA são caracterizadas por evoluírem rapidamente na escala evolutiva, mas seus arranjos genéticos frequentemente permanecem inalterados. Isso implica que, com poucas exceções, os arranjos genéticos são considerados estáveis dentro de grandes grupos, mas variável entre os mesmos e em escalas taxonômicas inferiores (BOORE, 1999). Em síntese, marcadores do mtDNA são capazes de identificar diferenças genéticas sucintas, mesmo entre espécies com mutações recentes e aquelas consideradas crípticas (MOSZCZYNSKA *et al.*, 2009; LOCKE *et al.*,

2010; GEORGIEVA *et al.*, 2013; HERNÁNDEZ-MENA *et al.*, 2017; LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2018; PÉREZ-PONCE DE LEÓN & HERNÁNDEZ-MENA, 2019).

Dentre os marcadores de mtDNA, os mais utilizados para o estudo filogenético de trematódeos digeneicos são os genes de subunidade da enzima *Citocromo Oxidase c* (COI ou *Cox*), sendo subdividido em COI e CO-2, tendo COI importante fragmento decodificador para a identificação de animais denominada DNA *barcoding* ou barcode (MOSZCYNKA *et al.*, 2009). A região COI é considerada uma sequência comum aos platelmintos e que possibilita a padronização de pesquisas filogenéticas entre trematódeos digeneicos que apresentam variações tanto interespecíficas quanto intraespecíficas, devido a geração de um “código de barras” único (DNA *barcoding*), depositado em bancos de dados genéticos, assim como uma biblioteca genômica (MOSZCYNKA *et al.*, 2009; LOCKE *et al.*, 2010; NADLER & PÉREZ-PONCE DE LEÓN, 2011). Além do COI-I, também se utiliza com frequência marcadores de outro fragmento de mtDNA, denominado *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase Subunit-1* (*Nad-1*) e, por apresentar maior acurácia que o marcador de DNA *barcoding*, também possibilita a diferenciação de espécies muito próximas ou crípticas (MORGAN & BLAIR, 1998; GEORGIEVA *et al.*, 2013). Porém, metodologias que utilizam mtDNA como *barcoding* e *Nad-1*, atualmente são mais utilizados em combinações com outros marcadores de distintas regiões (LOCKE *et al.*, 2010; VAN-STEENKISTE *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2016).

Dessa forma, devido às características de conservação com os marcadores de rDNA e variabilidade dos marcadores de mtDNA, atualmente é recomendável utilizar um ou mais marcadores de cada região de modo a aumentar o embasamento e confiabilidade nos estudos filogenéticos de trematódeos (MIURA *et al.*, 2005; VILAS *et al.*, 2005; LOCKE *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2016; BLASCO-COSTA *et al.*, 2016; LÓPEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2019). De fato, estudos que envolvem a biologia molecular têm assumido tamanha importância que, entre 2011 a 2015, 70% das publicações utilizaram um a dois marcadores genéticos e, em contrapartida, em 2015 menos de 10% dos trabalhos publicados não utilizaram essas metodologias (BLASCO-COSTA *et al.*, 2016).

Do ponto de vista operacional, para que seja possível o estudo envolvendo a biologia molecular, após obtenção de alguma fase evolutiva do trematódeo digeneico ou fragmentos do mesmo, ocorrem várias etapas, que se inicia com a extração de DNA e amplificação do fragmento genético de predileção com utilização *primers* específicos

para cada marcador e enzimas de restrição com uso da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Posteriormente, basicamente há a purificação do produto da PCR e sequenciamento genético do fragmento obtido. As sequências, quando viáveis, são editadas, alinhadas e comparadas junto a outras disponíveis nos bancos de dados genéticos, como exemplo, o *GenBank* (CRIBB *et al.*, 1998; OLSON *et al.*, 2003; SOLDÁNOVÁ *et al.*, 2017; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017; LÓPEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2018; PÉREZ-PONCE DE LÉON & HÉRNANDEZ-MENA, 2019). Entretanto, nesse âmbito, possíveis problemas podem restringir ou inviabilizar o estudo, como amostra tecidual insuficiente, dificuldade na obtenção de diferentes isolados de determinada região geográfica para comparação, contaminação da amostra, erros de sequenciamento e a convergência de sequências, principalmente entre táxons divergentes (NOLAN & CRIBB, 2005), assim como a falta de sequências em bancos de dados para comparações e a confiabilidade de que tal sequência realmente representa a respectiva espécie descrita.

1.3.3 Taxonomia integrativa na sistemática de trematódeos

Até o momento, observou-se que na taxonomia o delineamento de espécies é imprescindível para o conhecimento da biodiversidade, pois determina se organismos são membros da mesma entidade (DAYRAT, 2005). De fato, ao longo dos tempos, variadas técnicas de estudo avançam de modo a proporcionar melhor entendimento sobre a sistemática de trematódeos. Segundo Gotelli (2004), idealmente, os estudos taxonômicos devem abordar vários critérios, tais como: (1) As chaves taxonômicas devem ser descritas com detalhes de caracteres, assim como ilustrações (essas devem estar adjacentes ao texto), distinção de espécies próximas, assim como distribuição geográfica e informação sobre sítio de infecção, sendo que essas informações necessitam estarem disponíveis em meios de comunicação impressos e eletrônicos; (2) Nomes das espécies e história taxonômica com nomenclatura atual e abrangente, assim como acesso ao histórico de nomenclaturas anteriores para comparação; (3) Registros de espécies com fácil acesso às coleções taxonômicas depositadas; (4) Relações filogenéticas resolvidas como forma de conhecimento sobre a classificação atual das espécies, que possibilita a ilustração de táxons irmãos, assim como o status de espécies e comunidades inteiras. Essas filogenias preferencialmente devem estar embasadas em estudos moleculares, assim como as medidas de comprimentos de ramos.

Nesse aspecto, em relação à biologia de trematódeos, os estudos morfológicos e a biologia molecular, ainda que sejam ferramentas de grande valia para a sistemática, quando utilizadas isoladamente demonstram consideráveis limitações (LITTLEWOOD *et al.*, 2001; CRIBB *et al.*, 2003; BLASCO-COSTA *et al.*, 2016). Devido a esse fator, a interconectividade entre estudos e metodologias que visam o conhecimento da biodiversidade torna-se cada vez mais imprescindível, sendo denominada como Taxonomia Integrativa (DAYRAT, 2005; WILL *et al.*, 2005; POULIN & PRESSWELL, 2016). De fato, atualmente a taxonomia integrativa tem se tornado um ponto chave para o conhecimento da biologia de digeneicos entre os estudiosos, principalmente quando se trata da interconectividade de dados morfológicos e moleculares para o esclarecimento das relações taxonômicas, assim como conhecimento de ciclos, variação populacional, distribuição geográfica, de forma a contribuir para estudos em biodiversidade com maior confiabilidade e acurácia (GEORGIEVA *et al.*, 2012; GARCÍA-VARELA *et al.*, 2015; PÉREZ-PONCE DE LÉON *et al.*, 2015; BLASCO-COSTA *et al.*, 2016; LÓPEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2018; HERNÁNDEZ-MENA *et al.*, 2019).

1.3.4 Histórico da taxonomia de trematódeos no Brasil: do período colonial às atualidades

No Brasil, estudos sobre os parasitos, dentre eles, os platelmintos digeneicos, remontam desde o período da colonização exploratória portuguesa, ao final do século XIII ao século XIX, procedente das viagens científicas do naturalista e zoólogo austríaco Johann Natterer (1787-1843), que veio às Américas com a missão de coletar dados dos povos e dos animais que aqui habitavam, inclusive de diferentes regiões do país. Adicionalmente, as amostras coletadas eram enviadas ao continente europeu para análises aprofundadas pelos mais diversos especialistas, como antropólogos, arqueólogos, botânicos e zoólogos (TRAVASSOS *et al.*, 1969). Outros naturalistas, como Olsfers e Sello também tiveram suas jornadas na coleta de materiais para esses estudos (KOHN *et al.*, 2007). Dentre os pesquisadores incumbidos em analisar o material enviado, estava Karl Rudolphi (1771-1832), que munido de vasta coleção proveniente do Novo Mundo, estudou e descreveu muitos helmintos na então Universidade de Berlim, publicando em 1819, o livro intitulado *Entozoorum Synopsis*, com descrição de 993 espécies de parasitos oriundos de países de distintos continentes, inclusive do Brasil

(TRAVASSOS *et al.*, 1961; EDLER, 2011). Outro pesquisador que seguiu os passos de Rudolphi com contribuições para o conhecimento da fauna de trematódeos brasileiros foi o austríaco Karl Moriz Diesing (1800-1867), que publicou em 1850 o livro *Systema Helminthum*, sendo seu trabalho considerado como referência para taxonomistas da época (EDLER, 2011). Ainda no final do século XIX e meados do século XX, vários estudiosos agregaram de forma singular para a taxonomia de trematódeos sul-americanos, dentre eles, destacaram-se Brandes (1862-1941) e Dubois (1858-1940) com contribuições à taxonomia da superfamília Diplostomoidea Poirier, 1886 (DUBOIS, 1938; 1953) e família Cyclocoelidae Stossich 1902 (Brandes, 1892); assim como Looss (1861-1923) com pesquisas sobre diversos trematódeos, como aqueles pertencentes à superfamília Echinostomatoidea (Looss, 1899) e família Gorgoderidae (Looss, 1899) (BRAY *et al.*, 2005; GIBSON *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2005).

Já no início do século XX, outros estudiosos europeus, como Braun, Dietz, Fishoeder, Stossich e Kossak também puderam partilhar seus conhecimentos sobre a helmintofauna com material biológico proveniente do Brasil. Como visto, até o momento, o estudo de trematódeos do país era baseado exclusivamente na coleta e envio de amostras ao exterior para análise morfológica e posterior descrição de espécies por taxonomistas europeus. Devido a este fato, muitos holótipos e parátipos de digeneicos coletados em animais no território nacional durante esse primeiro período, atualmente encontram-se em museus ou universidades européias (DRONEN & BLEND, 2015 p.19, 60; KANEV *et al.*, p. 114, 179 *in* GIBSON *et al.*, 2005). Entretanto, ainda naquele mesmo século, iniciou-se a formação e conseqüente publicações de pesquisadores brasileiros, o que possibilitou estudos mais aprofundados sobre a biologia dos trematódeos aqui presentes, além de informações sobre aspectos patológicos dessas relações (PIRAJÁ DA SILVA, 1908; LUTZ, 1919; TRAVASSOS, 1922, DEANE, 1955). Dentre esses, destacam-se Pirajá da Silva, naquela época médico e residente em hospital localizado no estado da Bahia e, como já dito, realizou a descrição da espécie *S. mansoni*, além discutir aspectos epidemiológicos e biológicos sobre o agente zooantroponótico, sugerindo corretamente que a transmissão ocorria pela água, mas equivocadamente por ingestão de ovos (PIRAJÁ DA SILVA, 1908).

Em 1913, após o descobrimento de *S. mansoni*, foi inaugurado no país o Laboratório de Helminologia localizado no Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e, nesse período, sua coleção helmintológica esteve sob a coordenação do pesquisador José Gomes de Faria, que reunia acervos coletados por si mesmo e de vários pesquisadores em

expedições pelo país, além da compilação de já existente coleção helmintológica de museus e de outros institutos brasileiros, como o Butantan e Pasteur (NORONHA *et al.*, 2009). A partir daí, o médico pesquisador Adolf Lutz (1855-1940) assume grande importância na taxonomia de trematódeos brasileiros, somando metodologias de análises morfológicas às experimentações em hospedeiros, além de pesquisas à campo em animais e humanos, iniciando a fase da helmintologia moderna no país. Lutz é considerado um dos maiores cientistas e suas contribuições não se restringiram aos digenéticos, mas também a diversos campos da biologia, medicina e medicina veterinária (DEANE, 1955), sendo também responsável pelo desenvolvimento do exame parasitológico de sedimentação espontânea -Método de Lutz-, utilizado até na atualidade no diagnóstico de endoparasitos intestinais (LUTZ, 1919). Em relação à taxonomia de trematódeos, Lutz publicou vários estudos, por exemplo, com grupos pertencentes à superfamília Diplostomoidea e, dentre eles, propondo alguns gêneros válidos até na atualidade, como: *Hysteromorpha* (Lutz, 1931), *Prosostephanus* (Lutz, 1935); *Mesostephanus* (Lutz, 1935), *Gogatea* (Lutz, 1935), além de pesquisas com parasitos do gênero *Echinostoma* (Lutz, 1924) e estudos com formas imaturas, como cercárias e metacercárias (LUTZ, 1933).

Outro pesquisador contemporâneo de Lutz e que também prestou valiosas contribuições para o estudo de helmintos no país foi Lauro Travassos (1890-1970), responsável por descrever inúmeras espécies de trematódeos, assim como seus aspectos biológicos como, por exemplo: *Ophthalmophagus magalhaesi* Travassos, 1921 (Digenea: Cyclocelestidae) (Dronem, 2015); *Odhneriotrema microcephala* (Digenea: Clinostomidae) (Travassos, 1922); *Hippocrepis fuelleborni* Travassos & Vogelsang, 1930 (Digenea: Notocotylidae) (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1976), além de pesquisas aprofundadas sobre a sistemática de equinostomatídeos (TRAVASSOS, 1938) e clinostomídeos, com inúmeras outras publicações que, de 1913 a 1937 totalizaram 215 trabalhos científicos, além da publicação intitulada *Trematódeos do Brasil* (TRAVASSOS *et al.*, 1969), com catalogação das espécies já descritas no país até aquele momento. Ademais, a parasitologia clássica brasileira já se consolidava com renomados especialistas de várias subáreas, sendo possível então, a continuidade das pesquisas devido a formação de discípulos em distintas regiões do país. Com isso, as pesquisas brasileiras sobre essa subclasse de platelmintos baseavam-se, até o final do século XX, em estudos à campo, análises morfológicas e experimentações laboratoriais.

Mais recentemente, com o desenvolvimento de ferramentas de estudo a nível molecular na taxonomia, muitas metodologias e marcadores foram desenvolvidos com

aplicação na sistemática de digeneicos, sendo que, a partir dos anos 1990, já era possível acessar publicações com utilização de marcadores ribossomais em análises da sistemática destes platelmintos (LITTLEWOOD *et al.*, 1999; TKACH *et al.*, 2000; OLSON *et al.*, 2003; KOSTADINOVA *et al.*, 2003). No Brasil, a biologia molecular de trematódeos digeneicos começou a ser utilizada com foco naqueles agentes que apresentam importância médica e veterinária, com estudos envolvendo técnicas de PCR para diagnóstico da infecção por *S. mansoni* e *F. hepatica* em moluscos (JANOTTI-PASSOS *et al.*, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 2004) e somente a partir da segunda década foram observados os primeiros trabalhos com utilização de análise molecular na taxonomia (MARIGO *et al.*, 2011; PINTO *et al.*, 2015). Atualmente, pesquisas em taxonomia integrativa no país vêm assumindo imprescindível papel para o conhecimento de platelmintos a nível mundial, pois possibilita descrições e delimitações de espécies e, mais adiante, a elucidação de ciclos biológicos devido à correlação de distintas fases de vida, hospedeiros e localidades, como já dito anteriormente (PINTO *et al.*, 2018; LÓPEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2018; DIAS *et al.*, 2018; PELEGRINI *et al.*, 2019; PANTOJA *et al.*, 2019). Não obstante, estes estudos ainda têm muito que avançar, visto que inúmeros hospedeiros ainda não foram analisados quanto à sua helmintofauna, o que implica no desconhecimento da real diversidade de trematódeos do país (OSTROWSKI DE NÚÑEZ & SANTOS *in* CHOUDHURY *et al.*, 2016; POULIN *et al.*, 2020), assim como aspectos biológicos e ecológicos decorrentes dessas interações.

2 JUSTIFICATIVA

O estudo sobre a biologia dos trematódeos digeneicos é complexo e, ao longo do tempo, sofreu alguns direcionamentos, como interesse por agentes que apresentam potencial patogênico e zonas com maiores investimentos. Isso resultou em atraso no conhecimento da biologia desses platelmintos na região tropical do globo, a qual é detentora da maior biodiversidade do planeta. Por isso, apesar da diversidade de espécies de trematódeos relatadas no Brasil, a maior parte do ciclo de vida desses organismos permanece desconhecido. A avaliação da diversidade destes parasitos em meio urbano se torna imprescindível não apenas para ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade, mas também para a melhor compreensão das interações entre hospedeiros vertebrados e invertebrados que ocorrem neste tipo de ambiente. Se por um lado os impactos das alterações antrópicas no ciclo destes parasitos são pouco conhecidos, por outro lado, a potencial exposição de seres humanos aos helmintos zoonóticos que ocorrem nestes locais não pode ser negligenciada. Além disso, o complexo cenário relacionado ao trânsito de parasitos entre animais domésticos e silvestres é algo ainda pouco estudado em nosso meio. Todos estes aspectos são contextualizados na abordagem *One Health*.

Assim, o trabalho presente, procura pesquisar trematódeos digeneicos numa coleção dulcícola localizada em região urbanizada de uma metrópole, com utilização que aborda a taxonomia integrativa, de forma a contribuir sobre o conhecimento da biologia e sistemática dessa classe de platelmintos abundantes, porém ainda pouco conhecidos no país.

2. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar aspectos morfológicos, biológicos, moleculares e a diversidade de trematódeos digeneicos de animais domésticos e silvestres encontrados em uma lagoa localizada na Cidade Administrativa de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

3.1.2 *Objetivos específicos*

- A- Realizar levantamento malacológico na lagoa da CADM-MG;
- B- Avaliar a diversidade de larvas de trematódeos encontradas em moluscos na localidade;
- C- Diagnosticar a infecção natural por trematódeos na população de aves anseriformes que ocorre na lagoa da CADM-MG;
- D- Avaliar a presença de trematódeos nos animais vertebrados (peixes, mamíferos e ave) encontrados sem vida na lagoa da CADM-MG;
- E- Realizar estudos moleculares de trematódeos encontrados nos hospedeiros invertebrados e vertebrados da lagoa da CADM-MG;
- F- Utilizar metodologias que abordam a taxonomia integrativa, na tentativa de elucidar ciclos biológicos de trematódeos presentes na lagoa da CADM-MG.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Breve histórico

No primeiro semestre do ano de 2016 houve uma mortalidade súbita de Anseriformes domésticos (patos e marrecos) em uma das lagoas localizadas na Cidade Administrativa do Estado de Minas Gerais, Presidente Tancredo Neves. Isso levou as autoridades locais a entrarem em contato com a Escola de Veterinária da UFMG, sendo constatada mais tarde como a *causa mortis* das aves o quadro de botulismo, provavelmente consequente ingestão de alimentos deteriorados. Não obstante, neste mesmo período, foram atendidos no Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da UFMG dois exemplares de patos domésticos provenientes da mesma lagoa. Durante a anamnese, as aves apresentaram secreção ocular, opacidade da córnea e perda significativa da visão. Uma das aves evoluiu ao óbito. Durante o procedimento de necropsia foram recuperados trematódeos presentes na traqueia e outros recuperados da conjuntiva palpebral e membrana nictitante ocular. Além disso, um anseriforme vivo encaminhado ao departamento de Clínica e Cirurgia da EV-UFMG foi submetido ao procedimento de endoscopia com retirada de um trematódeo localizado na traqueia. Devido a oportunidade para avaliar a diversidade de trematódeos e relação parasito x hospedeiro na localidade, foi proposto um estudo mais aprofundado na LCADM-MG com direcionamento quanto à dinâmica de transmissão de trematódeos nas aves domésticas, assim como o rastreamento e coleta de possíveis hospedeiros intermediários no local. Não obstante, durante as pesquisas à campo, percebeu-se que além dos anseriformes, haviam vários outros animais, como capivaras, roedores menores, aves aquáticas, peixes e animais domésticos, além dos moluscos, expandindo-se assim as atividades e estudos na área.

4.2 Considerações éticas

Para que as intervenções fossem desenvolvidas na lagoa da Cidade Administrativa do Estado de Minas Gerais, primeiramente foi realizado um protocolo para o consentimento das ações no local junto aos responsáveis pela área (Secretaria de Estado de Planejamento e Gestão e Subsecretaria de Operação e Gestão de Projetos da Cidade Administrativa de Minas Gerais). Para adequação legal e ético quanto aos estudos dos animais invertebrados e vertebrados presentes na área, foram submetidos e aprovados: (1)

plano de ações junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) que faz parte do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob o código 52870-1 (coletas malacológicas); (2) plano para o aproveitamento de vertebrados encontrados sem vida na LCADM-MG sob o código 65433-1 (ICMBio); (3) protocolo de atividades como a contenção e manipulação a campo dos anseriformes domésticos aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA-UFMG, protocolo 254-2018); (4) plano para realização de infecção experimental de vertebrados em laboratório (protocolo CEUA-UFMG 21-2016). O acesso ao patrimônio genético foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).

4.3 Área de estudo

4.3.1 Caracterização geral da localidade

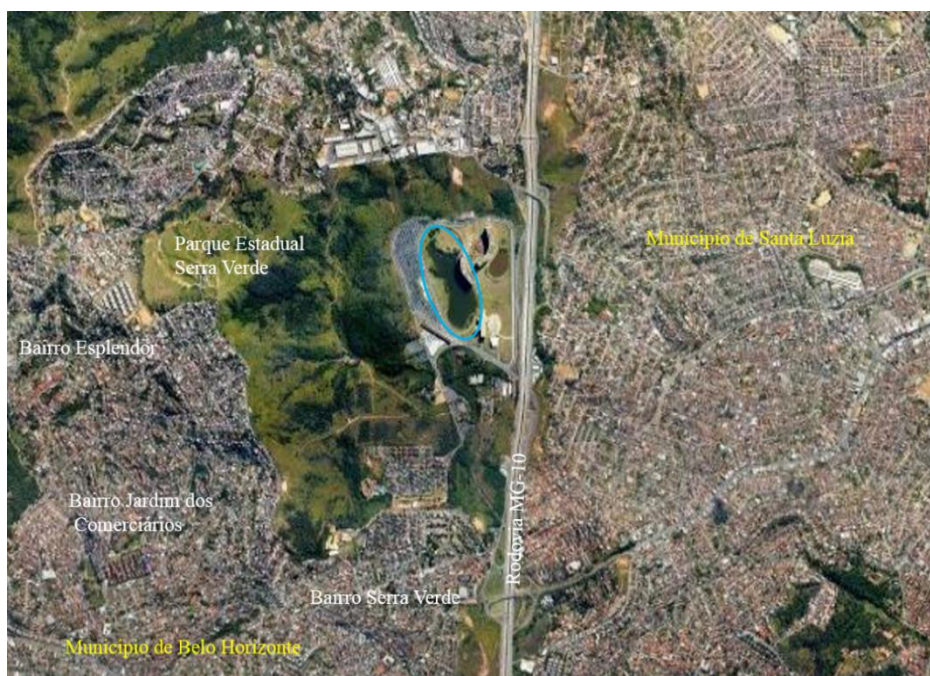
O estudo foi realizado em uma lagoa urbana localizada no vetor norte da metrópole de Belo Horizonte, município que atualmente apresenta aproximadamente 2,4 milhões de habitantes. A coleção dulcícola estudada encontra-se no bairro Serra Verde (Regional Venda Nova), na Cidade Administrativa de Minas Gerais (CAD-MG) Presidente Tancredo Neves (19° 47' 06.20"S e 43° 57' 11.41"W), sede dos três poderes estaduais, caracterizada por um conjunto arquitetônico. Essa região tem como característica ser urbanizada com crescimento populacional exponencial, sendo que atualmente apresenta aproximadamente 262.183 habitantes (densidade de 9.261,4 hab/km²), segundo o censo sociodemográfico de 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Além dessas características, a localidade está próxima à divisa de outros dois municípios Santa Luzia e Vespasiano, com acesso pela rodovia intermunicipal Papa João Paulo Segundo (MG-10). A lagoa foco do estudo é mantida pela coleta de água de origem pluvial, de uma fonte de água oriunda de nascente presente no Parque Estadual Serra Verde, além de nascente própria. Apresenta formato ameboide, contornando um dos prédios do conjunto arquitetônico, com aproximadamente 600 e 170 metros de comprimento e largura, respectivamente (FIGURA 1).

Atualmente, na localidade há a movimentação de grande número de trabalhadores, moradores dos bairros próximos que utilizam a área para práticas de esporte, lazer e também pesca. A água proveniente da lagoa segue o curso desaguando em outra coleção

dulcícola e mais adiante no córrego Floresta, onde localizam-se em áreas do seu entorno: centros de saúde, escolas, creches, residências, terrenos não construídos e vias públicas. O córrego Floresta é afluente do Ribeirão Isidoro, este último, transcorre em grande parte do seu percurso por comunidades carentes e ocupações irregulares, sendo esse ribeirão integrante do Rio das Velhas e, mais adiante, do Rio São Francisco.

Como um breve histórico da região da Cidade Administrativa de Minas Gerais, a princípio, essa área fazia parte de uma fazenda, sendo local de parada de tropeiros durante o século XVIII e mais adiante, a partir da década de 1980, foi realizada na região a construção de casas populares, com intenso processo de urbanização, sendo o local do parque Serra Verde doado à prefeitura de Belo Horizonte no ano de 1992. Até o ano de 2006, o local onde se encontra a lagoa do presente estudo integrava o Jockey Club de Belo Horizonte, sendo utilizada para lazer, trabalho, lavoura e criações animais. Na década de 1990 foram realizados nas lagoas da região estudos ecológicos envolvendo espécies de gastrópodes *Pomacea haustum*, *B. glabrata* e *B. tenagophila* com foco na pesquisa de transmissão de *S. mansoni* (FREITAS *et al.*, 1991; FREITAS & SANTOS, 1995). É importante mencionar que durante as obras de construção do conjunto

Figura 1 Coleção dulcícola localizada na Cidade Administrativa do Estado de Minas Gerais



Legenda: Coleção dulcícola marcada por círculo azul. À esquerda encontra-se o Parque Estadual Serra Verde e em seu entorno área urbana. Vista aérea.

Fonte: idesisema.meioambiente.mg.gov.br

arquitetônico, aproximadamente $\frac{1}{4}$ da principal lagoa da CADM-MG, foco do estudo, foi aterrada e atualmente há um extenso gramado no local.

4.3.2 Pontos de coleta e caracterização dos microhabitats

4.3.2.1 Delineamento

Para o presente trabalho, antes de serem iniciadas as coletas malacológicas efetivas, ao final do ano de 2016, foram realizadas no local coletas para rastreio de locais de interesse quanto ao ponto de vista helmintológico, como presença de hospedeiros vertebrados e invertebrados e, após essa primeira análise, foram determinados quatro locais, sendo denominados pontos de coleta A, B, C e D (FIGURA 2).

Figura 2 Vista aérea da lagoa principal da Cidade Administrativa e os pontos selecionados para coleta malacológica



4.2.3.2 Caracterização da área

No geral, as margens da lagoa, em sua maioria, são compostas por vegetação gramínea com poucas árvores, escassa ou ausência de plantas aquáticas, com fundo arenoso ou rochas arredondadas e apenas em um dos seus extremos pode-se observar vegetação mais abundante composta por arbustos e forrageiras, sendo que nesta área se

agrupam uma maior diversidade de animais domésticos e silvestres onde foram observadas características distintas, a saber:

Na área próxima a um dos prédios do conjunto arquitetônico encontram-se árvores junto à margem da lagoa, onde finas raízes entram em contato com o ambiente aquático e serve de refúgio para a fauna de peixes, insetos aquáticos e moluscos. Nesta zona, em parte de sua extensão, devido ao sentido da corrente de vento, há o movimento constante das águas como pequenas ondas e essa característica dá um formato côncavo da margem submersa consequente ao atrito. Nesse ponto é escassa a presença de plantas aquáticas, com o solo submerso numa de profundidade aproximada de 50cm e presença de rochas. Em sua extremidade, onde forma um “braço” da lagoa, tem-se recepção de água pluvial e acúmulo de matéria orgânica, como as folhas que caem das árvores. Aproximadamente 90 a 100 anseriformes domésticos frequentam essa área diariamente e também foram visualizadas durante várias coletas, fezes de capivaras na água e nas margens, além de cardumes que se agrupam próximo ao desaguamento na extremidade em busca de alimentos (FIGURA 3 A).

Já a área ao lado da descrita acima (sentido oposto do braço da lagoa), possui margens mais rasas e planas na área frontal, composta por solo arenoso e margem pouco mais profunda na área lateral, por volta de 50 a 70 cm de profundidade. Neste local, há um terreno plano, sombreado e cercado, utilizado como espaço para a alimentação e convívio dos anseriformes, com presença de arbustos, onde os mesmos fazem ninhos, se alimentam e passam a maior parte do tempo quando estão fora do ambiente aquático, junto a outros animais silvestres como capivaras e frangos d’água (FIGURA 3 B).

Após essa primeira caracterização, distanciando em aproximadamente 100 metros, porém na mesma extremidade, há um poço de recebimento de água pluvial, recebimento de água de nascentes do Parque Estadual Serra Verde e próximo ao local onde se encontra uma nascente própria (distância aproximada de 5 metros), sendo rodeada de um lado por vegetação arbustífera e do outro por forrageiras. Nesse local não há contato direto com o corpo d’água da lagoa, sendo separada por um desnível de aproximadamente 50 cm. A água, exceto quando há fortes pancadas de chuva, é pouco movimentada e acumula escasso material orgânico em decomposição. Além disso, em nenhuma coleta os anseriformes foram vistos no local, mas há grande frequência de movimentação de capivaras atraídas pelas forrageiras abundantes, sendo encontrado nessa área grande quantidade de material fecal desses roedores, além de pequenos peixes (FIGURA 3 C).

Por fim, próximo à área descrita acima, há um canal por onde desagua a água proveniente da nascente e das águas provenientes do poço, caracterizando um córrego. Este possui aproximadamente 30 metros de comprimento e variação entre 1 e 2 metros de largura e 50 cm de profundidade ao longo do seu curso. Suas margens são compostas por plantas aquáticas e arbustos, onde finas raízes muitas vezes são observadas em contato com a coleção aquática, tendo suas laterais côncavas. Nesse local, foram visualizadas aves aquáticas silvestres, pequenos cardumes de peixes, pegadas de roedores menores e capivaras que passam pelo local para chegar ao vasto gramado que circunda o conjunto arquitetônico (FIGURA 3 D).

Figura 3 Caracterização de área da Lagoa da Cidade Administrativa de Minas Gerais



Legenda: A e B) Local de aglomeração dos anseriformes domésticos. C) Poço com recebimento de água pluvial. D) Córrego que desagua na lagoa.

4.4 Coleta de moluscos e análise de infecção

Coletas malacológicas regulares foram realizadas mensalmente entre janeiro de 2017 e março de 2018 (total de 15 intervenções), com tempo de aproximadamente três horas em cada dia. Para a coleta de moluscos foi utilizado puçá com 50 cm de largura por 20 cm de profundidade de malha com abertura de 1mm. O material coletado foi acondicionado em sacos plásticos identificados e transportados ao Laboratório de Biologia de Trematoda para triagem posterior do material. Após esse período regular e com parte das análises realizadas, decidiu-se por realizar novas coletas em pontos específicos de interesse, sendo então realizadas duas coletas adicionais nos meses de junho e outubro de 2018 e cinco coletas em 2019, sendo duas em março, uma em abril e duas em maio, totalizando 9 coletas malacológicas adicionais.

Para observação de larvas de trematódeos, os moluscos encontrados foram lavados em água corrente, quantificados, colocados em placas de poliestireno 6, 12 ou 24 poços, dependendo do tamanho do espécime, com aproximadamente 2mL de água desclorada e expostos à luz artificial 60W uma distância de 40cm. Decorrida cada hora de exposição, as placas contendo os moluscos foram examinadas em estereomicroscópio para a detecção das cercárias. No próximo dia, pela manhã, antes de nova exposição à luz, as placas eram novamente avaliadas para constatar emergência de cercárias durante o período noturno. Em algumas coletas, exemplares de moluscos foram utilizados para pesquisa de formas evolutivas não emergentes. Para isso, após rompimento da concha dos moluscos entre lâminas por compressão mecânica, a parte mole dos moluscos foi retirada e colocada em placas de Petri contendo água, com rebatimento do manto e exposição dos órgãos internos. As formas evolutivas encontradas foram transferidas para outra placa de Petri contendo água, sendo algumas rédias dissecadas para observação de cercárias imaturas.

Além disso, espécimes de moluscos de cada morfotipo foram utilizados para identificação taxonômica. Inicialmente procedeu-se a imersão rápida do invertebrado em água à 70°C, com a retirada do corpo mole da concha e fixação em solução de Railliet-Henry. Posteriormente, foi realizada a dissecação, que consistiu no rebatimento do manto e posterior dissecação dos órgãos sexuais, digestivo e cavidade pericárdica para estudo morfológico das estruturas. A determinação taxonômica foi baseada em critérios conquiliológicos e/ou de anatomia interna segundo Paraense (1970, 1983ab), Paraense e Pointier (2003), Simone (2006) e Hayes et al. (2012).

4.5 Infecção experimental de hospedeiros vertebrados

4.5.1 Infecção em *Gallus gallus domesticus*

Como breve histórico, no ano de 2016, após diagnóstico de infecção por trematódeo ocular nos anseriformes domésticos, foram realizadas coletas malacológicas de rastreio na LCADM-MG afim de determinar o foco de transmissão. Nessa intervenção inicial, puderam ser obtidos moluscos da espécie *M. tuberculata* infectados com cercárias do tipo Megalura. Observou-se a ocorrência de encistamento dessas formas evolutivas nas paredes dos poços de poliestireno e nas conchas dos tiarídeos. A morfologia geral e aspectos da biologia sugeriram tratar-se de um trematódeo ocular (*Philophthalmus gralli*) previamente identificado em Belo Horizonte (PINTO & MELO, 2010). Visto isso, foi realizado junto ao Laboratório de Doenças das Aves (EV- UFMG) com a parceria do Professor Nelson Rodrigo da Silva Martins, um experimento que consistiu na infecção experimental de quatro espécimes jovens de *G. g. domesticus*, Estes animais foram utilizados em estudos visando desenvolver e testar metodologias de diagnóstico clínico-laboratorial e, posteriormente, de tratamento farmacológico da infecção ocular, com possíveis aplicações a campo.

Metodologia de infecção

O procedimento iniciou-se com o desencistamento de metacercárias presentes em placas de poliestireno utilizando água a 41°C, segundo descrito por Alicata (1962). A infecção experimental dos pintainhos ocorreu da seguinte forma: 20 metacercárias desencistadas foram gotejadas em cada saco conjuntival das aves com auxílio de pipeta *Pasteur*. Após a infecção, os animais eram então avaliados quanto a presença do parasitismo, que foi confirmada em todos os espécimes aos 20 dias após infecção (dpi). Também foram avaliadas duas vezes por semana durante o período de infecção possíveis alterações clínicas, como prurido e consequente autotraumatismo, hiperemia de mucosa e secreção ocular alterada.

Metodologia de diagnóstico

Aos 90 dpi, foram iniciados os testes para diagnóstico nos frangos, a saber:

Exame Oftálmico Direto (EOD): pesquisa de trematódeos digeneicos em estruturas oculares, como saco conjuntival e membrana nictitante, sendo a carga parasitária estipulada por avaliação semiquantitativa em que (-) corresponde a ausência

de trematódeos visíveis, (+) presença de 1 a 2 parasitos visíveis, (++) presença de 3 a 4 e (++++) acima de 5 parasitos visíveis ou aglomerados, respectivamente.

Lavagem de Saco Conjuntival (LSC): baseou-se na instilação de 200µl de solução salina no saco conjuntival ocular com auxílio de pipeta de Pasteur, sendo aspirados e instilados em 3 ciclos por intervenção de forma a garantir maior superfície de contato. O líquido reaspirado foi então acondicionado imediatamente em microtubos e fixado em formalina a 10% para então ser avaliado em microscópio óptico no aumento de 10x. Além disso, foram coletadas amostras fecais frescas semanalmente para avaliação quanto à presença de ovos nas fezes.

Protocolos de tratamento

A partir dos 120 dpi iniciaram os protocolos de tratamento, a saber: utilização de duas bases anti-helmínticas (Praziquantel- 10, 50 e 100mg/kg por via intramuscular aos 120, 134 e 148 dpi e o Fenbendazol- 50mg/kg em 3 doses por via oral em intervalos de 24 horas por dose), sendo os frangos considerados curados ao apresentarem, 7 dias após tratamento, tanto o EOD, quanto a LSC negativos. As aves que permaneceram infectadas foram contidas manualmente e os trematódeos restantes retirados com auxílio de pinça de ponta romba, sendo os parasitos fixados para estudos morfológicos (Tópico 4.7.1).

*4.5.2 Infecção em *Mus musculus**

Metacercárias encistadas oriundas de cercárias do tipo *Anfistoma* obtidas de *B. straminea* (TÓPICO 5.2.1), foram utilizadas para a infecção experimental de cinco espécimes de *Mus musculus* com 30 dias de idade.

A infecção por metacercárias ocorreu da seguinte forma: a partir da observação de cercárias emergidas dos moluscos, essas foram identificadas como sendo de interesse, coletadas dos poços de placas poliestireno, quantificadas (20 metacercárias/animal), agrupadas e inoculadas por via oral com auxílio de pipeta graduada de 50µl com carga infectante. Os roedores estavam em jejum hídrico e alimentar por cerca de 1 hora antes da infecção para facilitar ingestão das formas infectantes. Após a infecção, os animais foram mantidos em gaiolas com maravalha, água e alimento *ad libitum*. Após a infecção, foi injetado diariamente, por via subcutânea, o glicocorticoide fostato dissódico de dexametasona (Decadron, Ache, solução injetável, 4mg/ml) na dosagem de 50mg/kg, até o término do experimento. Os animais foram eutanasiados através da inoculação de superdosagem de barbitúrico (pentobarbital sódico), em diferentes dias sendo: dois aos

15 dpi, um aos 30 dpi, um animal aos 40 dpi e um aos 50 dpi. A recuperação de parasitos e processamento seguiu como apresentado no tópico (TÓPICO 4.8).

4.6 Coleta de amostras biológicas em anseriformes

Nos estudos a campo, primeiramente observou-se como era composta a população destas aves e o local onde elas se aglomeravam, sendo identificada três espécies: *Cairina moschata domestica* (patos domésticos), *Anas platyrhynchos domesticus* (marreco doméstico) e *Anser cygnoides domesticus* (ganso africano doméstico). Esses animais foram condicionados a aglomerarem em área onde funcionários forneciam alimento diariamente, sendo a maioria das aves com temperamento dócil e de aproximação fácil por seres humanos (FIGURA 4 A). O espaço de alimentação e aglomeração das aves foi aproveitado para condicionamento, contenção mecânica e realização dos seguintes procedimentos: avaliação física, colocação de anilha plástica numerada para identificação na pata direita e coleta de amostras para exame parasitológico (FIGURA 4 B).

Nos anseriformes domésticos foi possível realizar três procedimentos para coletas de fezes, sendo que as primeiras intervenções ocorreram na última semana de junho e primeira semana de julho de 2017, onde foi possível identificar e coletar amostras de 61 anseriformes, sendo 47 patos, 8 marrecos e 6 gansos (3 casais). Na segunda intervenção realizada em julho do mesmo ano, foi possível recapturar 21 espécimes de anseriformes sendo 15 patos, 3 marrecos e 3 gansos. A última intervenção foi realizada em agosto de 2017 e foi possível obter amostras de um total de 25 anseriformes, sendo 20 patos, 2 marrecos e 3 gansos identificados. As aves foram então restritas individualmente em gaiolas de aço gradeadas (medidas de 1 metro de comprimento, 60 cm de largura e 1 metro de altura, forradas com jornal) (FIGURA 4 C). Os anseriformes ficaram restritos individualmente durante 5 minutos ou tempo inferior até ser observada a defecação. Fêmeas com filhotes ou que estavam incubando ovos em ninhos não foram manipuladas. As amostras coletadas foram armazenadas em potes plásticos identificados com o número da anilha da ave, fixadas em formalina 10% e processadas pelo método de sedimentação espontânea com análise do sedimento em microscópio óptico para pesquisas de ovos de helmintos.

A avaliação da infecção por trematódeos oculares ocorreu no momento em que as aves estavam imobilizadas manualmente, sendo então realizados os exames de EOD e LSC. O tempo de duração foi estimado em aproximadamente 5 minutos/olho (FIGURA

4 D). As aves que tiveram EOD positivo para a presença de trematódeos na membrana nictitante e/ou saco conjuntival, foram imobilizadas manualmente com abertura das pálpebras e pinçamento dos espécimes de helmintos com auxílio de pinça de ponta romba, para evitar possíveis traumas mecânicos. Após a remoção, os parasitos obtidos foram acondicionados em microtubos com 1ml de solução salina, para posteriormente serem processados conforme descrito na análise de trematódeos adultos (TÓPICO 4.8).

Figura 4. Estudos a campo em anseriformes domésticos da LCADM-MG



Legenda: A) Anseriformes domésticos em área de convivência. B) Espécime de *Cairina moschata domestica*, detalhe da seta apontando anilha amarela numerada na pata direita. C) Espécime de *Anser cygnoides domesticus* restrito em gaiola forrada para coleta de material fecal. D) Exame oftálmico direto com observação de saco conjuntival em *Anser cygnoides domesticus*.

4.7 Avaliação de animais vertebrados encontrados sem vida

Animais encontrados mortos as margens da lagoa durante as coletas malacológicas, com tecidos ainda conservados indicando morte recente, foram também avaliados. Estes eram acondicionados em caixas de transporte e encaminhados ao Laboratório de Biologia de Trematoda para necropsia e recuperação de helmintos (TABELA 1).

Durante o procedimento de necropsia, após identificação e avaliação do estado geral, como lesões na pele, escore corporal (caquético, magro, normal), houve exposição da cavidade abdominal, identificação e seccionamento das vísceras com amarraduras de barbante para impedir o extravasamento de conteúdo do lúmen intestinal. As vísceras foram avaliadas macroscopicamente quanto a presença de lesões, acondicionadas em placas de Petri e refratários retangulares de vidro contendo solução fisiológica 0,85% e quando necessário, refrigeradas até a avaliação. O intestino delgado foi segmentado transversalmente em três partes, sendo: porção proximal, média e final. O intestino grosso foi seccionado transversalmente em ceco e cólon. O cólon, quando longo, também foi seccionado em três partes. Após essa primeira etapa, os segmentos intestinais foram então seccionados longitudinalmente, com exposição do lúmen e pesquisa de helmintos de maior tamanho a olho nu. Posteriormente, o bolo fecal foi então retirado com exposição da mucosa, sendo o conteúdo e o seguimento do órgão lavados com solução fisiológica 0,85% e retenção de material em tamis metálico com malha de 0,29mm. O conteúdo contido no tamis foi então colocado para sedimentação em cálices de vidro, sendo o material obtido acondicionado em placas de Petri e examinado em microscópio estereoscópio para pesquisa de helmintos. As demais vísceras como coração, fígado, rins e pulmões foram seccionadas e observadas macroscopicamente quanto a presença de helmintos, sendo o conteúdo colocado em placas com solução fisiológica e o líquido coletado para sedimentação em cálices, com aspiração do sedimento por pipeta de *Pasteur* e análise do sedimento como descrito acima. Para futuros estudos histopatológicos, fragmentos de órgãos parasitados com cerca de 1cm³ foram fixados em formol tamponado.

Adicionalmente, dados ecológicos sobre os trematódeos também são apresentados e os termos utilizados seguiram as definições apresentadas por Bush *et al* (1995).

Tabela 1. Espécies de animais vertebrados encontrados sem vida provenientes da lagoa da Cidade Administrativa de Minas Gerais avaliados quanto à infecção por trematódeos digeneicos

Classe	Ordem	Família	Espécies	Número avaliado
Ave	Gruiforme	Rallidae	<i>Gallinula galeata</i>	1
Mammalia	Rodentia	Caviidae	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	2
	Cichliformes	Cichlidae	<i>Australoheros sp.</i>	38
			<i>Oreochromis niloticus</i>	6
Actinopterygii	Characiformes	Erythrinidae	<i>Hoplias malabaricus</i>	5
	Cyprinodontiformes	Poeciliidae	<i>Poecilia reticulata</i>	9

4.8 Taxonomia Integrativa

4.8.1 Estudo morfológico

Para estudo morfológico e morfométrico foi utilizado microscópio de luz com auxílio de ocular micrometrada para trematódeos menores e estágios larvais e para trematódeos adultos maiores foi utilizado estereomicroscópio de luz com auxílio de régua milimetrada.

As cercárias encontradas foram analisadas em preparações não permanentes coradas por solução diluída de lugol e por corantes vitais sulfato azul do Nilo a 0,05% e vermelho neutro (PINTO & MELO, 2013a). Fotografias foram obtidas com utilização da câmera digital *LEICA ICC50 HD*® acoplada a microscópio da mesma marca, sendo as imagens capturadas posteriormente analisadas pelo *software Leica Application Suite*® (*LAZ EZ*) versão 2.0. Além disso, parte das cercárias foram mortas em água a 70°C, fixadas em formalina a 10% para posterior estudo morfológico. Alíquotas foram fixadas em álcool 95% para estudo molecular.

Os trematódeos adultos e metacercárias obtidos de animais vertebrados encontrados sem vida à beira da lagoa da LCADM-MG foram coletados como descrito: (1) após dissecação do tecido as formas livres foram coletadas com auxílio pipeta de *Pasteur* e pincéis; (2) as formas encistadas foram coletadas e desencistadas com auxílio de estilete em placas de Petri ou lâminas para microscopia. Os espécimes então foram colocados em solução fisiológica e observados em microscópio estereoscópio, além de serem quantificados e limpos com troca da solução e auxílio de pincéis. Em seguida, foram estendidos com água a 70°C (sendo os maiores antes desse processo, prensados entre lâminas) e fixados com formalina a 10%. Posteriormente, foram corados com carmim aceto-alúmen, desidratados em bateria crescente de etanol, diafanizados em creosoto de Faia e montados em lâminas permanentes com bálsamo do Canadá (TRAVASSOS, 1950; PÊSSOA & MARTINS, 1982). Os trematódeos robustos, que não puderam ser prensados entre lâminas, cortados de forma seriada em posição longitudinal-frontal e longitudinal-lateral, tendo como referência o poro genital, com auxílio de lâminas de aço inoxidável *Gillette*®, com aproximadamente 0,7 a 1mm de espessura, como recomendado por Jones & Seng (1986).

Fotografias foram obtidas com auxílio de câmera digital compacta *Samsung ES 70*® *12.2 Megapixels 27mm* acoplada ao estereomicroscópio de luz para trematódeos e estruturas maiores ou o microscópio de luz e para trematódeos ou estruturas menores (este

último as imagens foram obtidas assim como realizado para formas larvais). Quando necessário, as imagens foram editadas sem descaracterização pelo programa de edição de imagens *Photoshop PSCS6®*.

A identificação taxonômica, até a menor categoria possível, foi realizada com a utilização de chaves de identificação e listas de checagem de trematódeos, além de revisões taxonômicas e descrições de espécies publicados por diferentes autores (TRAVASSOS *et al.*, 1969; GIBSON *et al.*, 2002; OLSON *et al.*, 2003; GIBSON *et al.*, 2005; BRAY *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2005; KOHN *et al.*, 2007; DRONEN & BLEND, 2015; FERNANDES *et al.*, 2015; PEREZ PONCE DE LÉON & HERNADÉZ MENA, 2019).

4.8.2 Estudo molecular

4.8.2.1 Extração e quantificação de DNA

Amostras de formas evolutivas de trematódeos provenientes de hospedeiros invertebrados (moluscos) e vertebrados da LCADM-MG foram previamente fixadas em etanol e acondicionadas em freezer a -20°C até o processamento. Nas extrações de DNA foram utilizados dois kits: *Wizard® Genomic DNA Purification* (utilizado em amostras ≥ 1 mm ou o kit *QIAamp® Qiagen®* (utilizado quando a forma evolutiva do trematódeo digeneico foi considerada pequena (ex.: poucas cercárias e rédia). Antes de ser iniciado o processo de extração de DNA com uso dos kits, as amostras foram acondicionadas em microtubos de 1,5ml e lavadas com 100 μ l de água destilada três vezes consecutivas para retirada de etanol.

Quando do uso do kit *Wizard® Genomic DNA Purification*, adicionou-se ao microtubo contendo a amostra 600 μ l de solução refrigerada de EDTA/Solução de Lise Nucleica e 17,5 μ l (20mg/ml) de proteinase K, com homogeneização da amostra e manutenção em termobloco a 55°C *overnight*. No dia seguinte, para a lise e precipitação proteica foram adicionados 3 μ l de solução RNase e incubação do microtubo por 30 minutos à 37°C. Após a incubação, adicionou-se 200 μ l de solução de precipitação proteica com acondicionamento em recipiente com gelo por 5 minutos. Adicionalmente, a amostra foi centrifugada por 4 minutos (14.000g). Para o processo de precipitação e reidratação da amostra de DNA, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 600 μ l de isopropanol. Após essa etapa, a mostra foi novamente centrifugada durante 1 minuto (14.000g). Posteriormente, o sobrenadante foi aspirado descartado,

adicionando-se 600µl de etanol 70% à temperatura ambiente. A amostra novamente foi centrifugada (1 minuto e 14,000g) e após houve a retirada de máxima quantidade possível de etanol por aspiração com pipeta graduada. Por fim, o microtubo foi levado ao banho seco para evaporação do líquido por cerca de 30 minutos, na temperatura de 37°C. Decorrido esse tempo, foi adicionado 20µl da Solução de Reidratação de DNA ou água ultrapura, sendo o tubo então novamente acondicionado no banho seco (65°C por 60 minutos).

Já na extração com os kits *QIAamp® DNA Mini ou Micro- Qiagen®*, ao microtubo de 1,5ml contendo a amostra já devidamente lavada foi adicionado 180µl do tampão ALT e 20µl de proteinase K, sendo a amostra levada ao vórtex (1 min) e posteriormente acondicionada em banho seco à 56°C em overnight para a lise tecidual. Adicionalmente, em um novo microtubo (0,5ml) adicionou-se 200µl de solução tampão AL e 1µl da solução de carreador de RNA. A amostra foi então acondicionada em banho seco (70°C/10min), centrifugando brevemente após a incubação. Posteriormente, adicionou-se 200µl de etanol absoluto, levando a amostra ao vortex por aproximadamente 15 segundos e incubando à temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionalmente, com utilização de colunas e membranas presentes no *kit* do fabricante, aspirou-se o máximo de sobrenadante da amostra, com transferência da solução para a membrana que continha uma coluna encaixada, conforme orientação do fabricante. A amostra coluna foi então centrifugada (1 min/8.000rpm), trocando-se posteriormente apenas a coluna acoplada por uma nova. Após esse procedimento, foi adicionado à membrana 500µl de tampão AW1 repetindo o processo de centrifugação (1 minuto/8,000rpm). Em seguida, adicionou-se 500µl de tampão AW2 na membrana, com nova centrifugação semelhante a anterior. Na etapa seguinte, apenas a coluna foi trocada sendo levada para uma última centrifugação por 3 minutos (14,000rpm). Por fim, descartou-se a coluna, acoplando a membrana à microtubos de 1,5ml identificados, com adição de 20µl do tampão AE ou água ultrapura, posterior incubação por 1 minuto e logo depois levado para centrifugação (1 minuto/4,000 rpm). Essa última etapa foi repetida para recuperação de DNA excedente na membrana.

A dosagem do material genético obtido foi determinada pelo espectrofotômetro de micro volume *NanoDrop® ND-1000*, sendo a concentração de DNA determinada pela absorvância em 260nm. Avaliou-se também a pureza do DNA extraído através da relação absorvância nos comprimentos 260 e 280 nm. Esse procedimento foi realizado em duplicata (volume de 2µl por poço) e o controle (branco) foi determinado pela solução em que o DNA foi ressuscitado (solução de ressuspensão ou água ultrapura).

4.8.2.2 Amplificação

Tentativas de amplificação de diferentes genes de rDNA e mtDNA amplamente utilizados em estudos moleculares envolvendo trematódeos foram realizados no presente estudo. A seleção da região a ser explorada para cada espécie de trematódeo digeneico encontrada foi determinada após breve levantamento na literatura existente sobre estudos de biologia molecular envolvendo os marcadores e respectivos parasitos. As regiões de rDNA, mtDNA com os primers e condições para a PCR utilizadas são apresentadas na TABELA 2.

As quantidades de cada elemento para as reações de PCR foram padronizadas em estudos anteriores. O volume final para cada reação foi de 25 μ l, sendo: 2,5 μ l de solução de DNA obtida da extração na concentração entre 25-50ng, 12,5 μ l de solução da enzima *GoTaq Green Master Mix*[®] (Promega, EUA) ou *Platinum Taq Polymerase*[®] (Invitrogen, EUA), 8,75 μ l de água ultrapura e 1,25 μ l do mix de primers (0,625 de cada primer específico do marcador selecionado). A PCR foi realizada em termociclador *Labcycler*[®] (Sensoquest, Alemanha). Em cada reação foram utilizados um controle positivo de determinada amostra previamente testada e um controle negativo (água ultrapura), para averiguar presença de contaminantes. Após as reações, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% e marcados com *Unisafe Dye*[®] *Nucleic Acid Staining Solution* (20.000x) na quantidade de 1,5 μ l para cada 30ml de tampão Triacetato-EDTA (TAE) 0,5M de forma a possibilitar observação de bandas em câmara com luminosidade ultravioleta.

As amostras utilizadas para estudo molecular, assim como os respectivos marcadores estão apresentados no APÊNDICE 1.

Tabela 2. *Primers* utilizados para a amplificação de regiões de DNA ribossomal e mitocondrial, assim como condições de PCR e tamanho dos amplicons utilizados para amostras de trematódeos digeneicos provenientes da Lagoa da Cidade Administrativa de Minas Gerais

Região	Marcador	Primers	Sequências dos primers	Condições no termociclador	Fragmento (pb)	Referência
rDNA	28S	Dig-12	AAG CAT ATC ACT AAG CGG	94°C por 2 min; 40 ciclos: 94°C por 30s; 56°C por 30s, 72°C por 2 min; 72°C por 7 min.	1.200	TKACH <i>et al.</i> , 2003
		1500-R	GCTATCCTGAGGGAAACTTCG			
	ITS	D1-F	AGGAATTCCTGGTAAGTGCAAG	94°C por 2 min; 35 ciclos: 94°C por 30s, 50°C por 30s, 72° por 10 min	1.100	MOSZCZYNSKA <i>et al.</i> , 2009
		D2-R	CGTTACTGAGGGAACCTGG			
ITS	BD-1	TCTAGATGCGTTCGAAGTGTCGATG	94°C por 2 min; 35 ciclos: 94°C por 30s, 50°C por 30s, 72° por 10 min	1.000	LUTON <i>et al.</i> , 1992	
	BD-2	TATGCTTAAATTCAGCGGGT				
ITS-2	3S	GGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTG	94°C por 2 min; 35 ciclos: 94°C por 30s, 50°C por 30s, 72° por 10 min	400	BOWLES <i>et al.</i> , 1995	
	BD-2	TATGCTTAAATTCAGCGGGT				
mtDNA	COI	JB3	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT	94°C por 2 min; 35 ciclos: 94°C por 30s, 45°C por 30s, 72°C por 60s; 35 ciclos de 94°C por 60s; 72°C por 7min.	800	MIURA <i>et al.</i> , 2005
		COI1-R trema	CAACAAATCATGATGCAAAAGG			
	COI	Dice 1-F	ATTAACCCTCACTAAATTWCNTTRGA	94°C por 2 min; 3 ciclos de 94°C por 40s, 51°C por 40s, 72°C por 60s; 5 ciclos de touchdown: 94°C por 40s (-1°C/ciclo); 72°C por 60s; 35 ciclos de 94°C por 40s, 45°C por 40s, 72°C por 60s e 72°C por 5 min.	600	VAN STEENKISTE <i>et al.</i> , 2015
		Dice 11-R	TCATAAG TAATACGACTCACTATAGCWAAC HAAATTHCGATC			
		PlatDiplo COX1F PlatDiplo COX1R	CGTTTRAATTATACGGATC AGCATAGTAATMGCAGCAGC			
COI	123F 858R	ATTCGTTTGA ACTATATGGA CATATGATGAGCCCAAACAAC	94°C por 2 min; 94°C POR 60s, 3 ciclos de 46°C por 30s e 72°C por 60s; 94°C por 60s; 3 ciclos de 45°C por 30s e 72°C por 60s; 20 ciclos de 94°C por 60s; 44°C por 30s e 72°C por 60s; 72°C por 7 min.	690	LAIDEMITT <i>et al.</i> , 2017	
NAD 1	NDJ1 ND1J2A	AGATTCGTAAGGGCCTAATA CTTCAGCCTCAGCATAAT	95°C por 5 min; 35 ciclos de 30s cada a 94°C; 48°C por 20s, 72°C por 45s, 72°C por 4 min.	400	MORGAN & BLAIR, 1998	

4.8.2.3 Purificação

Os produtos de PCR em que foi possível obter bandas com tamanho esperado no gel de agarose foram selecionados para o processo de purificação. Para isso, o conteúdo presente nos microtubos de 0,2ml onde foi realizado a PCR foram concentrados (spin) e transferidos para microtubos de 1,5ml. Após o procedimento, foram adicionados 25µl de solução a 20% de polietilenoglicol (PEG) (NaCl 2,5 M e PEG 20%) e então os tubos colocados no vórtex por aproximadamente 2 minutos para a homogeneização. Após esse período, os tubos foram levados para o banho seco a 37°C por 30 minutos. Decorrido o tempo, houve o processo de centrifugação do conteúdo (15 min/13.000rpm). Os tubos foram então retirados da centrífuga e o sobrenadante aspirado com pipeta, restando ao final, aproximadamente 10µl de solução. Em seguida adicionou-se 125µl de etanol 80% gelado e foi realizada centrifugação (5 min/13.000rpm). Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e o ciclo a partir do momento que se adiciona o etanol 80% novamente repetido. Ao final do processo, o sobrenadante foi novamente descartado. O tubo foi então colocado em banho seco, destampados (mas protegidos com papel toalha) por aproximadamente 30 minutos, ou até que não tivessem vestígios de etanol. Após esse processo, realizou-se a ressuspensão em 20 µl água ultrapura e posteriormente realizou-se a leitura da concentração (ng de DNA/ µl de solução) de fragmentos obtidos em *NanoDrop*® ND-1.000. Junto à leitura de concentração, uma nova eletroforese em gel de agarose 1% conforme descrito anteriormente, foi realizada antes do envio para sequenciamento.

4.8.2.4 Sequenciamento

A solução contendo *amplicons* purificados foram preparados utilizando-se tubos com a solução obtida na concentração necessária com primers *forward* e *reverse* a partir das determinações para o procedimento da empresa *Myleus Biotecnology*® (Belo Horizonte, Brasil). O sequenciamento em ambas as direções foi realizado por capilaridade eletroforese no sequenciador *ABI3730*, com polímero *POP7* e kit de sequenciamento *BigDye v3.1* (Applied Biosystems®, Foster, EUA).

4.8.2.5 Análise das sequências

As sequências consenso foram editadas usando o programa ChromasPro versão 2.0.1 (Technelysium Pty Ltd, Australia) e os contigues comparados com outras sequências disponíveis no *GenBank*, inicialmente através da pesquisa de similaridade utilizando-se a ferramenta *Blast* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O programa Clustal W, implementado em MEGA7.0 (KUMAR *et al.*, 2016) foi utilizado para o alinhamento das sequências geradas. Os métodos selecionados para análise filogenética foram o de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana usando os programas MEGA7.0 e MrBayes 3.1.2, respectivamente (RONQUIST *et al.*, 2012). Os modelos de substituição nucleotídica foram obtidos com base no resultado de menor valor de razão de verossimilhança pelo Bayesian Information Criterion (BIC) pelo programa MEGA 7.0. Em alguns casos estes modelos foram substituídos por outro equivalente ou próximo quando houve restrição de análise na versão MrBayes 3.1.2. Os grupos externos foram selecionados de acordo com estudos já publicados anteriormente, variando de acordo com o marcador e os táxons (OLSON *et al.*, 2003; LAIDEMITT *et al.*, 2017; SERENO-URIBE *et al.*, 2019). Para a inferência filogenética, foi utilizada a plataforma de análise computacional CIPRES (MILLER *et al.*, 2010). Na análise de Máxima Verossimilhança, as árvores foram geradas pela plataforma IQ-TREE e os suportes dos clados estimados pelo método de *Bootstrap* (10.000 replicações). No caso da análise de IB, os valores de probabilidade posterior foram determinados pelo método de Monte Carlo via cadeias de Markov, em duas corridas de quatro cadeias, por 10^6 gerações, com amostragem de topologias a cada 100 gerações, descartando as primeiras 25% das árvores amostradas como '*burn-in*'. As árvores geradas foram visualizadas e pelo programa Fig Tree 1.4.2 (RAMBAUT *et al.*, 2012), sendo então editadas pelo programa PowerPoint® (Windows 7®) e no Photoshop CS5 Adobe®. As sequências moleculares obtidas serão depositadas no *GenBank* conforme ocorrerão as publicações. As amostras utilizadas para estudo molecular e selecionadas para comparação pareada estão apresentadas no APÊNDICE 2.

5. RESULTADOS

5.1 Considerações sobre os pontos de coleta e procedimentos realizados

À princípio, as coletas malacológicas seriam consideradas em relação ao aspecto parasitológico (larvas de trematódeos obtidas de moluscos) interligado ao aspecto ecológico com inclusão das variações sazonais. Entretanto, conforme ocorriam as intervenções na lagoa durante as estações de cheia e seca do ano, percebeu-se que o clima teve forte influência sobre o modo das coletas (FIGURA 5 A e B) e que, por isso, para relacionar o encontro de moluscos e suas as infecções sobre a influência da sazonalidade haveria muita dificuldade.

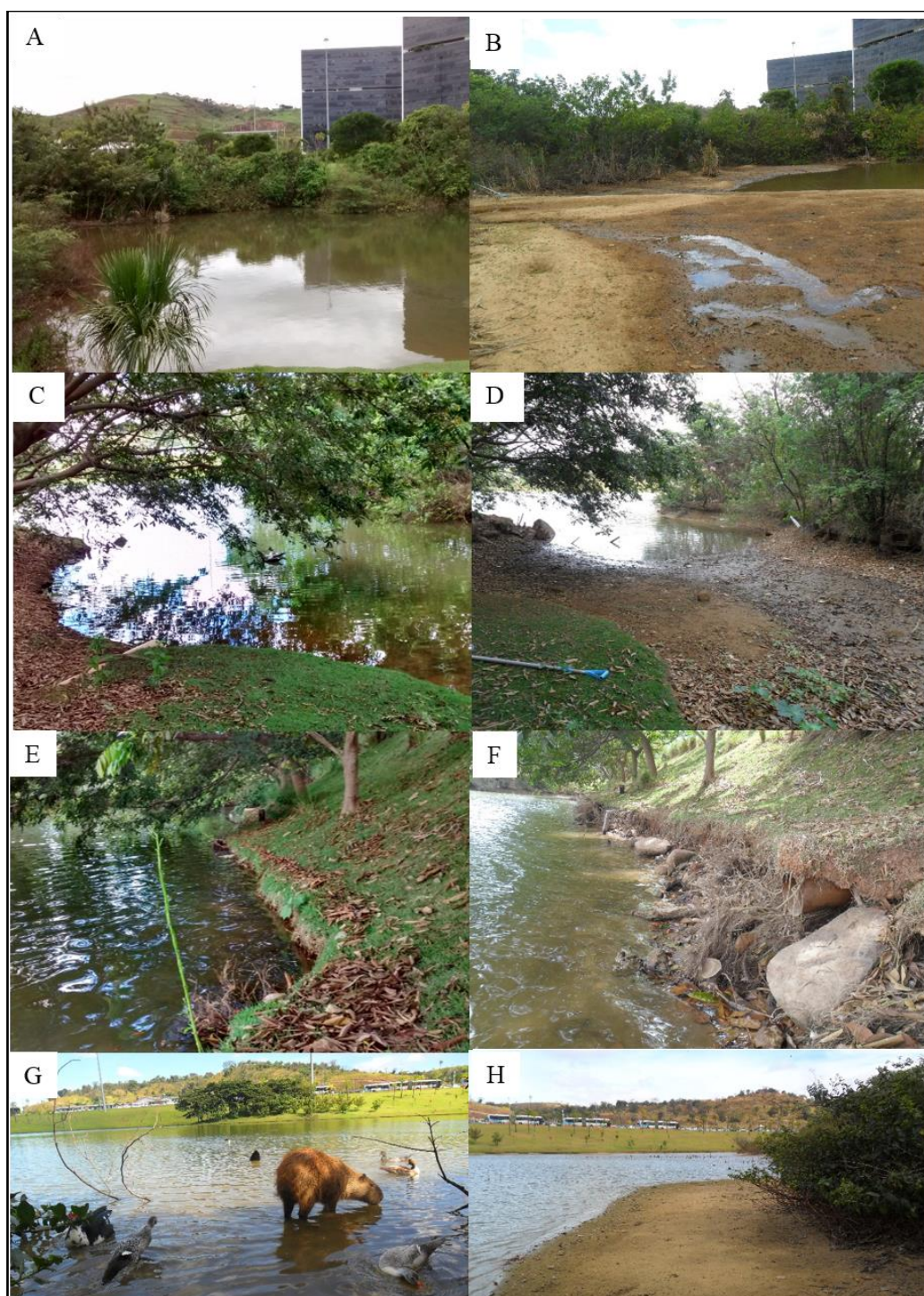
Todos os pontos de coleta, exceto o local C passaram por intensas modificações climáticas devido ao período chuvoso e seco. No ano de 2017, a cidade de Belo Horizonte passou por uma estiagem severa devido a um período chuvoso irregular advindo desde o ano anterior e posteriormente a um período seco extenso. Na localidade, em setembro de 2017 chegou a 100 dias sem chuvas e, como consequência, nesse período o nível de água na lagoa foi reduzido em aproximadamente 0,5 metro. Na extremidade onde existe a comunicação dos pontos A e B por um “braço” da lagoa, ao final do ano de 2016 a meados de 2017, foram observados durante as coletas malacológicas cardumes de peixes e a presença constante dos anseriformes que interagiam e se alimentavam no local (FIGURA 5 C). Entretanto, devido à estiagem, na coleta de setembro de 2017 foi possível adentrar no leito seco entre esses dois pontos com observação de acúmulo de material orgânico em decomposição (FIGURA 5 D).

Ainda em 2017, no ponto de coleta A, as raízes das árvores que antes ficavam submersas até o primeiro trimestre, com a estiagem e diminuição progressiva nos níveis da água passaram a ficar cada vez mais expostas e secas, sendo dificultada uma coleta satisfatória em grande parte da extensão desse local, que tem ao fundo pedras (FIGURA 5 E e F). Já no ponto de coleta B, onde há uma extensão em frente à lagoa, rasa (menos que 0,5 metro de profundidade), com solo arenoso, onde os anseriformes eram observados a nadar e alimentarem-se daquilo que encontravam no local (sendo observado durante as coletas muitas conchas de moluscos tiarídeos – *Melanooides* sp.- e bivalves- *Corbicola* sp.-) (FIGURA 5 G), durante o período de estiagem, entretanto, devido ao recuo das águas, formou-se um banco de areia e onde antes não era possível alcançar, passou-se a ter fácil acesso (FIGURA 5 H). O ponto de coleta D também passou por intensas transformações climáticas e no auge da estiagem no mês de setembro, havia no local

apenas um filete de água proveniente da nascente, não sendo possível a coleta malacológica. Apenas ao final do mês de outubro de 2017 foi observado aumento dos níveis de água devido às chuvas que se iniciaram em meados desse mesmo mês, mas o nível de água da lagoa voltou a normalidade alcançando a margem, somente em dezembro do mesmo ano. Além disso, também houve o viés comportamental, onde em algumas coletas teve-se restrição do uso do coletor mais voltado para a superfície da água onde havia vegetação abundante e mais profundo onde havia escassez desse material e o leito poderia ser alcançado.

Já no primeiro semestre de 2018, os níveis de água da lagoa permaneceram com a lâmina d'água alcançando a margem do corpo aquático nesse período até aproximadamente o final do mês de abril.

Figura 5. Pontos de coleta malacológica na Lagoa da Cidade Administrativa do Estado de Minas Gerais no período chuvoso (fevereiro de 2017) e seco (setembro de 2017).



Legenda: A) Vista da lagoa próximo ao desagüamento do ponto de coleta D no período chuvoso e B) no período seco. C e D) Ponto de coleta A e B (vista frontal) no período chuvoso e período seco. E e F) Ponto de coleta A no período chuvoso e período seco- observar raízes expostas e concavidade da margem. G e H) Ponto de coleta B no período chuvoso e no período seco- exposição do banco de areia com conchas de moluscos.

5.2 Coleta de moluscos e infecção por larvas de trematódeos

Foram realizadas de janeiro de 2017 a março de 2018 o total de 15 coletas malacológicas nos pontos pré-determinados, coletados 6.908 moluscos gastrópodes pertencentes a cinco espécies: *Biomphalaria straminea*, *Melanoides tuberculata*, *Physa acuta*, *Pomacea* sp. e *Pseudosuccinea columella*. A quantidade de moluscos, assim como o número absoluto e prevalência de infecção por larvas de trematódeos durante o período regular de coleta são apresentados na TABELA 3. Destes, apenas em *M. tuberculata* e *B. straminea* foram observados infectados por trematódeos.

Tabela 3. Moluscos coletados, número total, infectados e prevalência por larvas de trematódeos sem considerar os pontos de coleta, observados durante estudo malacológico realizado na Lagoa da Cidade Administrativa do Estado de Minas Gerais, Brasil no período de janeiro (2017) a março (2018)

Moluscos	Coletados	Infectados	Prevalência (%)	Tipos cercarianos e metacercárias
<i>Biomphalaria straminea</i>	1.861	272	14,62	7
<i>Melanoides tuberculata</i>	4.545	80	1,78	3
<i>Physa acuta</i>	354	0	0	0
<i>Pomacea</i> sp.	147	0	0	0
<i>Pseudosuccinea columella</i>	1	0	0	0
Total	6.908	351	5,08	10

Além do período regular demonstrado acima, entre junho de 2018 e maio de 2019 foram realizadas coletas focadas, com um total de sete intervenções. O tiarídeo *M. tuberculata* nesse período também foi a espécie de molusco coletada em maior quantidade (76,18%), seguido de *B. straminea* (11,23%), *Physa acuta* (7,9%), *Pomacea* sp. (2,95%) e *P. columella* (1,73%), como apresentado na TABELA 4 e no somatório de todas as coletas realizadas sendo apresentado na TABELA 5. Dentre estas, foi possível averiguar a infecção por larvas de trematódeos nas espécies de *B. straminea*, *M. tuberculata* e *Pomacea* sp.

Tabela 4. Moluscos coletados, número total, infectados e prevalência de espécimes infectados por larvas de trematódeos sem considerar os pontos de coleta, observados durante estudo malacológico realizado na Lagoa da Cidade Administrativa do Estado de Minas Gerais no período de junho (2018) a maio (2019)

Moluscos	Coletados	Infectados	Prevalência (%)	Tipos cercarianos e metacercárias
<i>Biomphalaria straminea</i>	247	55	22,27	5
<i>Melanooides tuberculata</i>	1.676	13	0,78	3
<i>Physa acuta</i>	174	0	0	0
<i>Pomacea</i> sp.	65	1	1,54	1
<i>Pseudosuccinea columela</i>	38	0	0	0
Total	2.200	69	3,14	9

Tabela 5. Moluscos coletados, número total, infectados e prevalência de espécimes infectados por larvas de trematódeos sem considerar os pontos de coleta, observados durante estudo malacológico realizado na Lagoa da Cidade Administrativa do Estado de Minas Gerais no período de janeiro (2017) a maio (2019)

Moluscos	Coletados	Infectados	Prevalência (%)	Tipos cercarianos e metacercárias
<i>Biomphalaria straminea</i>	2108	327	15,51	8
<i>Melanooides tuberculata</i>	6621	93	1,40	3
<i>Physa acuta</i>	528	0	0	0
<i>Pomacea</i> sp.	212	1	0,47	1
<i>Pseudosuccinea columela</i>	39	0	0	0
Total	9508	421	4,43%	12

5.2.1 *Biomphalaria straminea*

Nas intervenções regulares, os locais com maior quantidade coletada de *B. straminea* foram os pontos C (91,72%, 1.707/1.861) e A (4,72%, 88/1.861). O período seco do ano de 2017 – abril a outubro - apresentou a maior taxa de espécimes coletados 54,9% (1.023/1.861), com média de moluscos coletados de 146,14 moluscos/mês e também do valor total de infectados 50,2% (138/275) (TABELA 6). Além disso, o período seco obteve um total de 138 moluscos infectados por larvas de trematódeos em 7 meses de coleta e o período chuvoso com intervalo entre novembro de 2017 a março de 2018 compreendeu um total 100 infectados/ 5 meses de coleta, sendo que esses dois períodos apresentaram praticamente a mesma média de moluscos infectados (19,7 e 20 infectados/coleta, respectivamente) e o período compreendido entre janeiro a março de 2017 (chuvoso) apresentou média de 12,33 moluscos infectados/coleta.

Tabela 6. Espécimes de *Biomphalaria straminea* coletados na lagoa da Cidade Administrativa do Estado de Minas Gerais no período de janeiro de 2017 a março de 2018 em distintos pontos de coleta

Ponto de coleta	A	B	C	D	Total/período	Infectados/período	
						Total	Prevalência
2017							
Janeiro/2017	*	0	51	*	51	6	11,76
Fevereiro	*	0	33	*	33	1	3,03
Março	1	0	163	*	164	30	18,29
Abril	0	6	235	3	244	30	12,29
Maiο	1	0	178	5	184	13	7,06
Junho	10	4	210	11	235	35	14,89
Julho	45**	11	121	1	178	30	16,85
Agosto	12	5	81	3	101	15	14,85
Setembro	10	0	32	0	42	11	26,19
Outubro	2	0	37	PS	39	4	10,26
Novembro	0	0	77	*	77	11	14,29
Dezembro	0	2	54	*	56	20	35,71
2018							
Janeiro	0	1	98	3	102	28	27,45
Fevereiro	7	1	107	5	120	23	19,16
Março	0	0	230	5	235	18	7,66
Total coletados	88	30	1.707	36	1.861	275	14,77
Infectados	41	17	213	1	275	-	-
Prevalência	50,61	56,66	12,47	2,77	14,77	-	-

Cinza: período chuvoso. Branco: período seco. (*) não coletado, (**) realizada duas coletas no período.

Na análise parasitológica, em *B. straminea* foi possível verificar a infecção por 6 tipos cercarianos e uma metacercária intramolusco, a saber:

- (1) Anfistoma (*Amphistome*): encontrado uma única vez no ponto de coleta A e realizada infecção experimental em *M. musculus* com metacercárias (TÓPICO 5.3.2).
- (2) Distoma Brevifurcada: referente aos pontos de coleta A e C.
- (3) Distoma Longifurcada Faringeada (*Longifurcate pharyngeate distome*) (Estrigeocercária) - três distintas cercárias com esse morfotipo foram encontrados referentes aos pontos de coleta A e D.
- (4) Equinostoma (*Echinostome*): esse tipo cercariano foi encontrado apenas referente ao ponto de coleta A.
- (5) Monostoma (*Monostome*): constatado em todos os pontos de coleta (A, B, C e D) e em todos os meses do ano em pelo menos um ponto de coleta.
- (6) Monostoma Longifurcada Faringeada (*Longifurcate pharyngeate monostome*): foi encontrado uma única vez referente ao ponto de coleta D.
- (7) Metacercária do tipo *Tetracotyle*: A infecção intramolusco foi constatada apenas nos pontos A e B. Foram observadas em duas ocasiões coinfeções com larvas do tipo Monostoma e Equinostoma.

Nas coletas realizadas em períodos subsequentes (de junho 2018 a maio de 2019) foi possível coletar 248 espécimes de *B. straminea* e identificar quatro tipos cercarianos e dois tipos de metacercária, todos já descritos anteriormente, exceto uma metacercária intramolusco. As larvas foram identificadas como dos tipos: (1) Anfistoma, referente aos pontos de coleta A e B; (2) Distoma Longifurcada Faringeada, referente aos pontos de coleta A e B; (3) Equinostoma, referente ao ponto de coleta B; (4) Monostoma, referente a todos os pontos de coleta. Além das cercárias, foram visualizadas formas rédias e metacercárias intramolusco. As formas infectantes possuíam formato arredondado e uma rédia que continha em seu interior cercárias sem a presença de cauda, sendo esse material fixado em etanol 95% para estudo molecular.

Estes tipos cercarianos foram submetidos a estudos adicionais, sendo então identificadas oito espécies de trematódeos, as quais, serão apresentadas posteriormente com mais detalhes na descrição taxonômica em tópicos específicos.

5.2.2 *Melanoides tuberculata*

Os locais com maior quantidade coletada de *M. tuberculata* foram: ponto A (61,01%, 2.773/4.545) e ponto B (30,47%, 1.385/4.545). Os dois pontos de coleta mencionados correspondem, como já dito, a um “braço” da lagoa, sendo lados de margens opostas interligadas onde aglomeram-se os anseriformes. O período seco do ano de 2017 – abril a outubro - apresentou o maior número de espécimes coletados 67,35% (3.061/4.545), com média de 437,3 moluscos coletados/mês e também de infectados 69,13% (56/81) (TABELA 7). Além disso, esse mesmo período apresentou a maior média de moluscos infectados (média de 8 moluscos infectados/coleta), seguido do período chuvoso entre novembro de 2017 a março de 2018 (média de 5 moluscos infectados/coleta) e o período chuvoso compreendido entre janeiro a março de 2017 com média de 1,66 moluscos infectados/coleta.

Tabela 7. Espécimes de *Melanoides tuberculata* coletados na lagoa da Cidade Administrativa do Estado de Minas Gerais no período entre janeiro de 2017 a março de 2018 em distintos pontos de coleta

Ponto de coleta	A	B	C	D	Total/período	Infectados/período	Prevalência
2017							
Janeiro	*	*	4	*	4	0	0
Fevereiro	*	5	12	*	17	2	11,76
Março	6	260	8	*	274	3	1,09
Abril	11	581	9	0	601	12	1,99
Maiο	30	308	4	21	363	12	3,30
Junho	38	150	13	6	207	9	4,35
Julho	33	65	0	0	98	2	2,04
Agosto	47	371	56	4	478	6	1,25
Setembro	414	473	49	0	936	11	1,17
Outubro	210	161	7	PS	378	4	1,06
Novembro	31	34	33	*	98	1	1,02
Dezembro	112	135	8	*	255	2	0,78
2018							
Janeiro	173	91	14	7	285	6	2,10
Fevereiro	13	77	0	3	93	4	4,30
Março	267	62	68	61	458	7	1,52
Total coletados	1.38	2.773	285	102	4.545	81	1,78
Infectados	23	56	2	0	81	-	-
Prevalência	1,66	2,02	0,70	0	1,78	-	-

Cinza: período chuvoso. Branco: período seco. (*) não coletado, (**) realizada duas coletas no período, PS ponto seco.

Em *M. tuberculata* foram encontrados três tipos cercarianos, a saber:

- (1) Gimnocéfala (*Gymnocephalus*) – referente aos pontos de coleta A e B.
 - (2) Megalura (*Megalurous*) - Esse tipo cercariano foi observado apenas referente aos pontos de coleta A e B. Exceto no mês de janeiro e fevereiro de 2017, todas as demais coletas apresentaram pelo menos um exemplar com emergência desse morfotipo cercariano.
- No laboratório pôde ser observado formação de metacercárias em meio externo com infecção experimental em *G. gallus domesticus* (TÓPICO 5.3.1).
- (3) Pleurolofocerca (*Pleurolophocercous*) - Esse morfotipo cercariano foi coletado em dois pontos de coleta distintos (B e C).

Nas coletas realizadas em períodos subsequentes (2018/2019) foi possível coletar mais 1.676 espécimes, sendo identificados 3 tipos cercarianos, todos já descritos anteriormente, sendo: (1) Gimnocéfala, referente aos pontos de coleta A e B; (2) Megalura referente aos pontos de coleta A e B; (3) Pleurolofocerca, referente ao ponto de coleta B.

Esses tipos cercarianos foram submetidos a estudos adicionais, sendo então identificadas três espécies de trematódeos, as quais serão apresentadas posteriormente com mais detalhes na descrição taxonômica em tópicos específicos.

5.2.3 *Pomacea* sp.

Este molusco gastrópode não apresentou infecções por trematódeos nos períodos regulares de coleta realizados entre janeiro de 2017 a março de 2018. Entretanto, na coleta realizada em abril de 2019, foi possível observar infecção de um espécime coletado do ponto de coleta D pelo tipo cercariano Xifidiocercária (*Xiphidiocercaria*). Esse tipo cercariano foi submetido a estudo morfológico, com alíquotas fixadas em etanol 95% para futura análise molecular.

5.3 Infecções experimentais em vertebrados

5.3.1 *Gallus gallus domesticus*

Após infecção experimental de espécimes jovens de *G. g. domesticus*, todos os animais apresentaram parasitismo pelo trematódeo ocular identificado como *P. gralli*, sendo observados parasitos adultos no EOD em estruturas como o saco conjuntival e membrana nictitante, além da recuperação de ovos pela metodologia de LSC, a saber:

Exame Oftálmico Direto (EOD): essa metodologia possibilitou nesses espécimes galiformes a confirmação da infecção por *P. gralli*, sendo possível avaliar e detectar o parasitismo em todos os animais (FIGURA 6 A e B), com variações desde a negativo (-), na ave que não apresentou trematódeo em um dos olhos, a positivo (de +, ++ e +++) (nas aves que variaram de 1 a mais que 5 parasitos por olho). Em 3 dos 4 frangos foi observado infecção bilateral e um deles apresentou infecção por apenas um espécime de trematódeo em um dos olhos (infecção unilateral), mas durante todo o experimento não foi observado alterações clínicas como hiperemia de conjuntiva, prurido e secreções patológicas advindas do parasitismo.

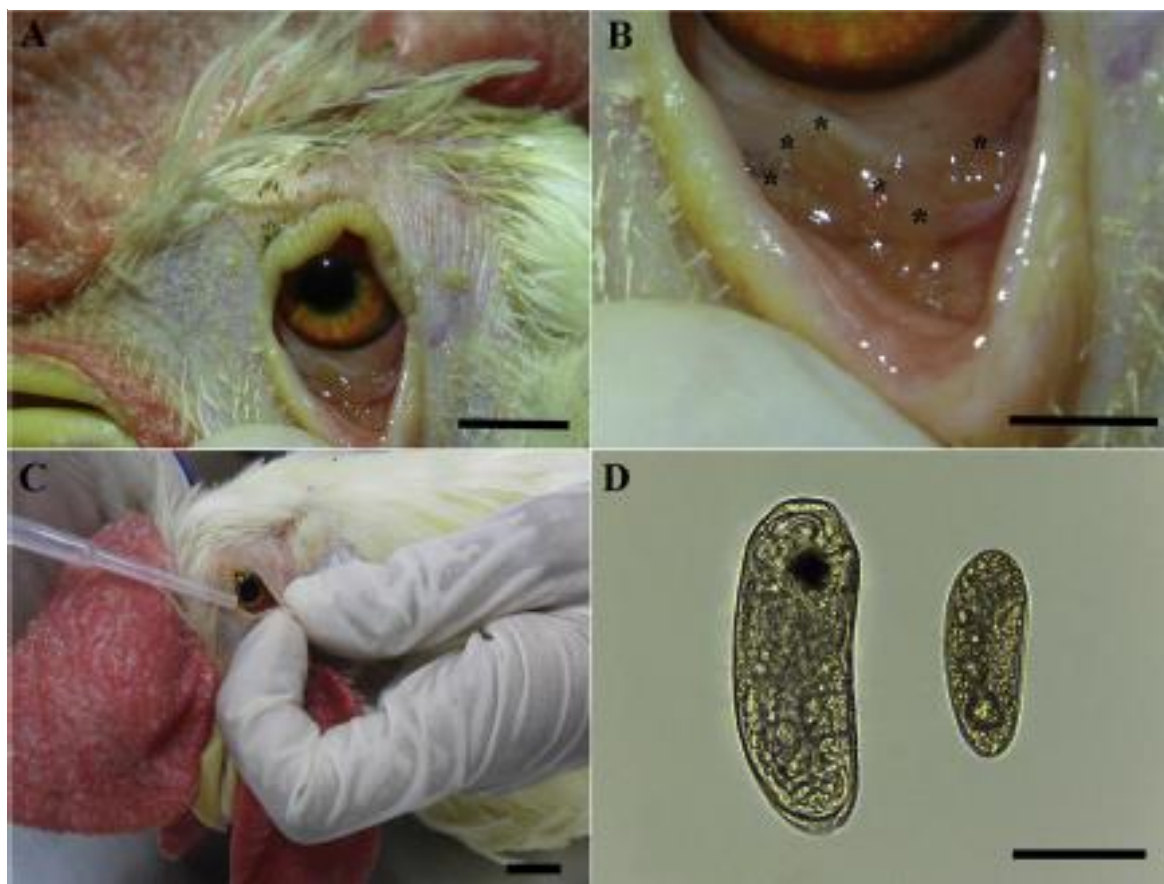
Lavagem de Saco Conjuntival (LSC): com esse método foi possível obter ovos viáveis e inviáveis de *P. gralli* em todos os olhos parasitados dos galiformes (7/8), exceto na ave com infecção unilateral, em que apenas a estrutura ocular parasitada apresentou ovos (FIGURA 6 C e D).

Em relação ao tratamento aos tratamentos antihelmínticos, estes, em sua maioria, foram bem tolerados pelas aves, exceto com o praziquantel na dose de 100mg/kg/IM. Como efeitos colaterais observados, os frangos apresentaram prostração, hipotermia, déficit de equilíbrio. Essas alterações tiveram duração aproximada de 3 horas. Além disso, no local de aplicação da solução, formou-se uma nodulação regular e rígida que permaneceu até ao final do experimento. Sobre os protocolos de tratamento testados, todos demonstraram ineficácia na total eliminação da infecção por *P. gralli* em *G. g. domesticus*. O tratamento com praziquantel nas doses de 10 e 50mg/kg/IM (1x), não modificaram os resultados positivos de EOD e LSC nos olhos que já estavam parasitados quando as aves foram reavaliadas aos 7 e 14 dias após tratamento. Entretanto, quando utilizada a dose de 100mg/kg (1x), na ave número 3, o EOD foi negativo para visualização de trematódeos, mas a LSC permaneceu positiva em ambos os olhos como observado aos 14 dpt. No último protocolo de 50mg/kg por via oral (3x- 24/24hr), dois frangos (1 e 3) tiveram ambos os olhos negativos tanto no EOD quanto na LSC em reavaliação realizada

7 dpt. Além disso, ressalta-se que nas análises de material fecal, em nenhuma amostra avaliada durante o experimento foram observados ovos de *P. galli* pelo exame de sedimentação espontânea.

Posteriormente, procedeu-se com a retirada mecânica dos parasitos em 3/4 aves que apresentaram a presença do trematódeo. No total, foram retirados 6 trematódeos de 3 aves que permaneceram infectadas até o final do experimento (números 1, 2 e 4). Destes animais, o frango 1, ainda que parasitado até o final do experimento, teve a LSC com resultado negativo a partir da dosagem de praziquantel 50mg/kg (1x), mas o trematódeo recuperado demonstrou poucos ovos intrauterino.

Figura 6. Infecção experimental por *Philophthalmus gralli* realizada em *Gallus gallus domesticus*



Legenda: A) Realização de Exame Oftálmico Direto evidenciando trematódeos em saco conjuntival ocular. B) EOD demonstrando quantificação de seis espécimes de *P. gralli* visualizados (+++). C) Lavagem de Saco Conjuntival com instilação e reaspiração da solução salina. D) Presença de ovos de *P. gralli* no líquido reaspirado e fixado em formalina. Em detalhe, à esquerda um ovo viável e à direita um ovo inviável. Escalas: A-10mm, B-5mm, C-10mm, D-50 μ m.

5.3.2 *Mus musculus*

A partir da observação de cercárias do tipo Anfistoma obtidas de *B. straminea* durante a coleta malacológica e observação da formação de metacercárias, foi realizada infecção experimental em cinco espécimes de *Mus musculus*. Como resultado, em todos os animais foram obtidos trematódeos digeneicos no intestino grosso, a saber: nos dois espécimes eutanasiados aos 15 dpi foi possível recuperar 9/20 (45%) e 12/20 (60%); aos 30 dpi foram recuperados 15 indivíduos (75%) em um espécime, aos 40 dpi puderam ser recuperados 11 digeneicos (55%) e aos 50 dpi foram recuperados 16 (80%). Nesse primeiro momento, os trematódeos foram identificados morfológicamente como *Zygodotyle lunata* (Diesing, 1836). As informações taxonômicas e filogenéticas estão apresentadas no TÓPICO 5.8.1.7.

3.4 Resultado das intervenções a campo em vertebrados

5.4.1 Infecção por trematódeos em anseriformes domésticos

5.4.1.1 Trematódeo ocular

Em relação ao trematódeo ocular, o EOD determinou uma prevalência de 67% (4/6), 31% (15/47) e 25% (2/8) verificadas respectivamente em *A. c. domesticus*, *C. m. domestica* e *A. p. domesticus*. No geral, as aves apresentaram parasitismo considerado leve (até 2 trematódeos), exceto para 2 exemplares de gansos com intensidade de infecção classificada como moderada e alta (3 a 5 e >5 parasitos por olho), não sendo observadas em nenhum animal ao exame clínico lesões macroscópicas aparentes das estruturas oculares. Durante todas as intervenções a campo, em apenas um espécime de *A. c. domesticus*, que apresentava carga parasitária como sendo +++ (acima de 5 trematódeos por olho), foi possível a obtenção de ovos do parasito pela técnica de LSC, os demais anseriformes permaneceram com resultados do exame negativos até o final do estudo, ainda que o EOD tenha sido positivo. Em março de 2019, em visita à lagoa foram reavaliados 3 espécimes de *A. c. domesticus* (2 machos e 1 fêmea) e em um macho foi possível visualizar um trematódeo no saco conjuntival, com a retirada mecânica do mesmo após contenção. Em relação aos espécimes de *C. m. domestica* foi possível capturar 4 exemplares (2 machos e 2 fêmeas) sendo recuperados 7 e 1 espécimes de *P. gralli* em 2 machos. Ainda nesta intervenção, no macho em que pôde ser recuperado um

trematódeo foram visualizados mais espécimes com impossibilidade de retirada segura. Já nas duas fêmeas de *C. m. domestica*, foram recuperados 4 parasitos e 1 parasito respectivamente. Todos os anseriformes nessa última coleta já se apresentavam sem anilhas de identificação.

Durante as intervenções à campo, com utilização da técnica de retirada mecânica dos parasitos, foi possível recuperar o total de 32 espécimes adultos de trematódeo ocular em *A. c. domesticus* e 25 espécimes em *C. m. domestica*, sendo 19 adultos e 6 imaturos, como demonstrado na TABELA 8. Em *A. p. domesticus*, ainda que o EOD tenha possibilitado a visualização dos trematódeos, por motivos técnicos e de segurança dos animais, a saber: são mais inquietos na contenção manual, possuem conjuntiva ocular menor e com menos possibilidade de exploração pela pinça, infelizmente não foi possível a recuperação de espécimes nessa espécie animal.

Tabela 8. Identificação dos anseriformes domésticos infectados por trematódeo ocular na LCADM-MG e número de espécimes recuperados

Anseriformes	Identificação	Trematódeos recuperados
<i>Anser cygnoides domesticus</i>	314 (F)	3
	316 (F)	2
	375 (Ma)	8
	376 (Ma)	19
	Total	32
<i>Cairina moschata domestica</i>	304 (Ma)	3
	306 (F)	1
	308 (Ma)	6
	312 (Ma)	3
	SA 1 (Ma)	6
	SA 2 (F)	4
	SA 3 (Ma)	1
	SA 4 (F)	1
	Total	25

Legenda: (Ma) - macho. (F) - fêmea. SA- sem anilha.

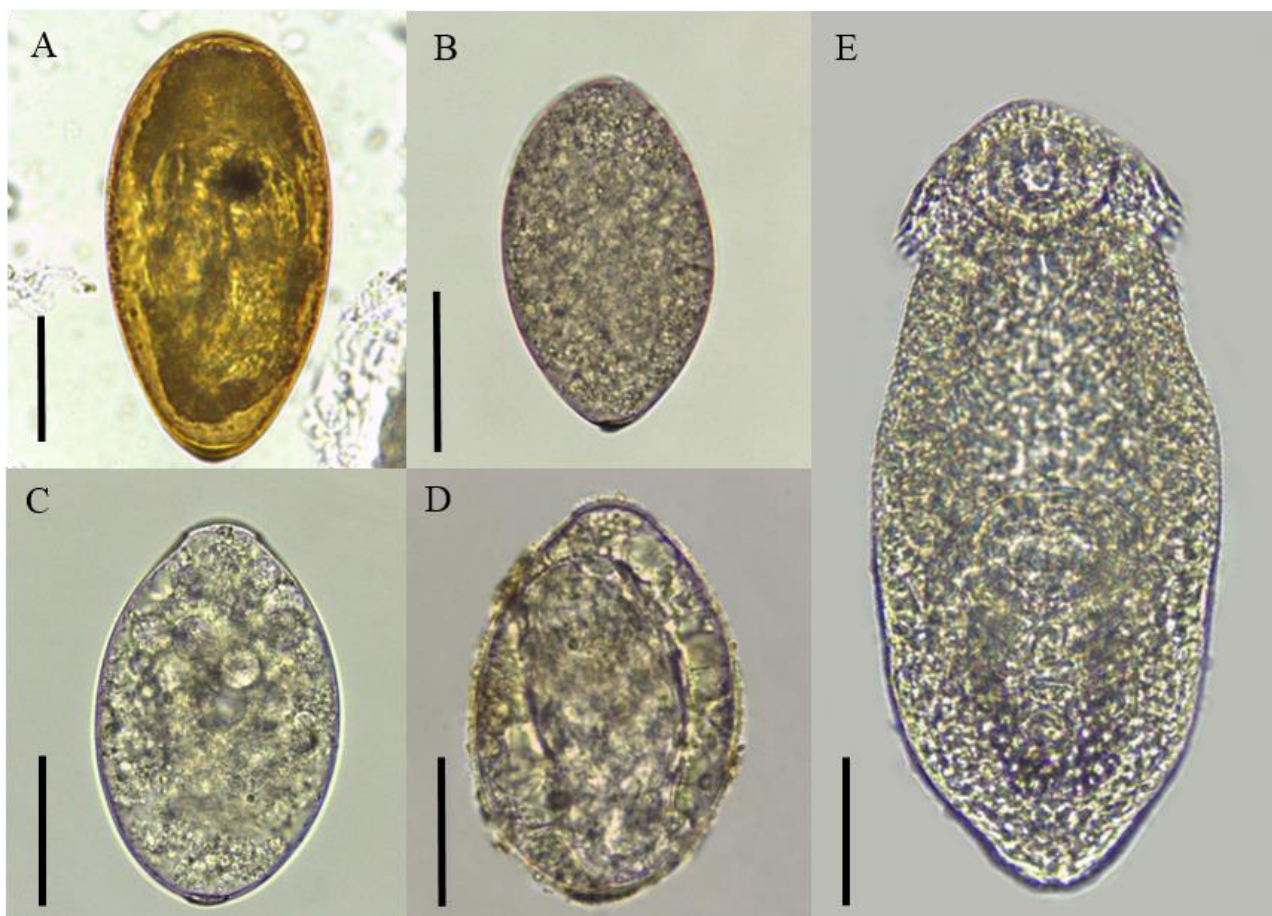
5.4.1.2 Exame parasitológico fecal em anseriformes da LCADM-MG

Durante a captura e recaptura dos anseriformes domésticos para coletas de material fecal, ressalta-se, que das 61 aves identificadas com anilha numerada, apenas 9 (14,75%, 9/61) tiveram a possibilidade de terem suas fezes coletadas nas três intervenções realizadas. Neste aspecto, um animal obteve resultado positivo nas 3 amostragens (11%, 1/9), um obteve resultado positivo em 2 amostragens (11%, 1/9) e os demais (7/9, 77%) foram positivos em apenas uma das três análises realizadas.

Das três intervenções realizadas, na primeira amostragem foram identificados três tipos de ovos de trematódeos, sendo um ovo característico de *T. cucumerinum* (FIGURA 7 A), um ovo pertencente a espécie não identificada (FIGURA 7 B) e um ovo semelhante aqueles pertencentes a espécie *Z. lunata* recuperados de *Mus musculus* infectados experimentalmente (FIGURA 7 C). Neste aspecto, procedeu-se com a coleta de ovos deste último trematódeo, que foram então incubados durante 13 dias para observação da formação e características dos miracídios (FIGURA 7 D).

De forma geral, das 61 amostras coletadas, 20 apresentaram ovos nas fezes em pelo menos uma coleta (32,78%, 20/61). Desses, amostras de 9 anseriformes foram positivas em pelo menos uma coleta para ovos característicos de *T. cucumerinum* (45%, 9/20) e 12 para ovos dos outros dois digeneicos (55%, 11/20). Espécimes de *C. m. domestica* tiveram maior prevalência nas infecções por trematódeos, com 16,66% para *T. cucumerinum* (8/47), 18,75% (9/47) para os outros dois trematódeos (*Z. lunata* e digeneico não identificado) e prevalência de coinfeção de 8,33% (4/47) das aves. Além disso, dos oito exemplares de *A. p. domesticus* avaliados, três (37,5%) apresentaram positividade nas amostragens, sendo um com infecção única por *T. cucumerinum*, um com coinfeção por *T. cucumerinum* e *Z. lunata* e, por último, uma ave que apresentou coinfeção com presença de ovos do trematódeo não identificado e por *Z. lunata*. Em relação aos seis espécimes de *A. c. domesticus*, em apenas um animal foi observado poucos ovos semelhantes a espécie *Z. lunata*, em apenas uma coleta. Por último, em um dos patos foi possível a observação de uma metacercária livre de equinostomatídeo durante um único exame de material fecal (FIGURA 7 E).

Figura 7. Trematódeos identificados por exame parasitológico direto com material fecal de anseriformes domésticos presentes na LCADM-MG



Legenda: A) Ovo característico de *Typhlocoelum cucumerinum*. B) ovo de trematódeo não identificado. C) ovo de *Zygocotyle lunata* obtido a fresco e D) incubado por 13 dias. E) Metacercária de equinostomatídeo. Escalas: 50 μ m.

5.5 Trematódeos em vertebrados encontrados sem vida na LCADM-MG

Durante o período em que foi estudado o ambiente aquático, assim como o habitat a sua volta, foi possível obter informações sobre alguns dos hospedeiros vertebrados ali presentes. Como resultado geral, nos peixes foram observadas apenas formas imaturas de trematódeos digeneicos, enquanto que nas aves e mamíferos foram recuperados trematódeos em sua fase evolutiva adulta, a saber:

Peixes: nestes vertebrados, foram recuperadas metacercárias. Enfatiza-se, antes de iniciar a apresentação desses resultados que esses vertebrados foram estudados no local consequente ao procedimento de coleta malacológica, sendo que mesmo realizando uma breve triagem do material à margem da lagoa, alguns peixes, principalmente aqueles de coloração que facilitavam camuflagem em meio ao sedimento (folhas e plantas aquáticas), eram então observados quando da triagem mais cuidadosa no laboratório.

Ave: no gruiforme silvestre *Gallinula galeata* juvenil (frango d'água), foram identificadas três espécies de trematódeos.

Mamíferos: em dois exemplares de *H. hydrochaeris* (capivara), foram recuperadas três espécies de trematódeos digeneicos pertencentes a três famílias distintas. Os hospedeiros avaliados *post mortem*, assim como os trematódeos classificados até a menor ordem taxonômica possível estão apresentados na TABELA 9.

Tabela 9. Identificação de hospedeiros vertebrados encontrados sem vida provenientes da lagoa da Cidade Administrativa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, assim como a identificação dos trematódeos recuperados

Hospedeiro vertebrado infectado	Forma evolutiva	Família	Menor categoria possível
<i>Australoheros</i> sp.	Metacercárias	Clinostomidae	<i>Clinostomum</i> sp.
<i>Hoplias malabaricus</i>	Metacercárias	Diplostomidae	<i>Tylodelphys</i> sp.
<i>Poecilia reticulata</i>	Metacercárias	Heterophyidae	<i>Centrocestus formosanus</i>
	Metacercária	Strigeidae	<i>Apharyngostrigea</i> sp.
<i>Gallinula galeata</i>	Adultos	Philophthalmidae	<i>Philophthalmus gralli</i>
	Adultos/imaturos	Echinostomatidae	<i>Echinostoma</i> sp.
	Adultos	Cyclocoelidae	<i>Cyclocoelum mutabile</i>
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Adultos	Notocotylidae	<i>Hippocrepis hippocrepis</i>
	Adultos	Fasciolidae	<i>Fasciola hepatica</i>
	Adulto/imaturos	Cladorchiidae	<i>Taxorchis</i> sp.

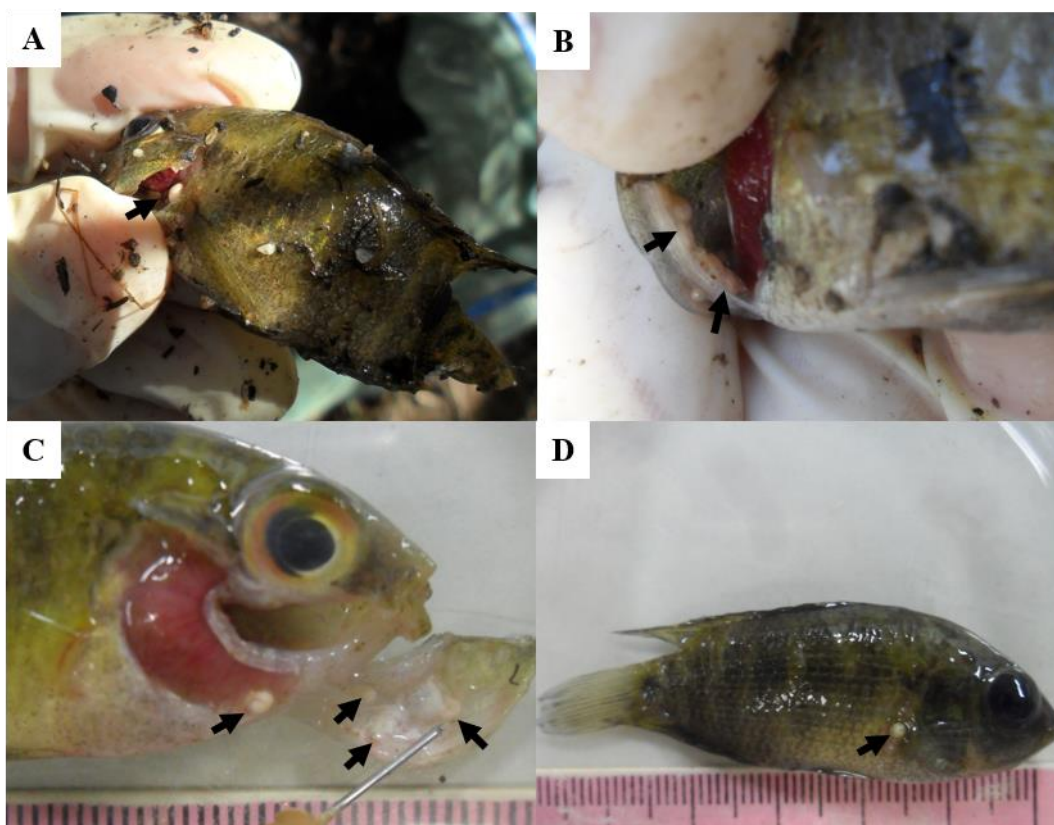
3.5 Análise dos hospedeiros *post mortem*

5.6.1 Achados de necropsia em peixes

***Australoheros* sp.**

Ao obter o encontro de espécimes de *Australoheros* sp. no sedimento da coleta, no laboratório, durante a necropsia, percebeu-se que os vertebrados se encontravam em condições físicas satisfatórias, sem qualquer lesão aparente. Em relação ao parasitismo por trematódeos, as metacercárias de *Clinostomum* sp. eram visualizadas facilmente com a abertura do opérculo (FIGURA 8 A e B). As larvas apresentavam movimentação ativa dentro de cistos maleáveis de coloração esbranquiçada e tamanhos variados, geralmente aglomeradas, podendo ser observadas facilmente à olho nu. A localização desses cistos em quase toda totalidade era a cabeça do animal, mais especificamente na face interna do opérculo e base das brânquias (FIGURA 8 C), além de algumas encontradas no palato e seios craniais e um único caso em que uma metacercária pôde ser localizada na base de uma nadadeira lateral (FIGURA 8 D).

Figura 8. Metacercárias de *Clinostomum* sp. encistadas em *Australoheros* sp. proveniente da LCADM-MG



Legenda: A, B e C- Setas -metacercárias encistadas na face interna do opérculo e base das brânquias. D- Seta- metacercária encistada na base de nadadeira.

Hoplias malabaricus

Assim como a espécie anterior, os cinco exemplares dessa espécie também não apresentavam qualquer lesão ou trauma aparente durante a necropsia, sendo que apenas no espécime de maior comprimento (9,5cm) estava parasitado. Os espécimes de *Tyloodelphys* sp. foram observados no momento da secção da cabeça do vertebrado, apresentavam movimentos natatórios rápidos e ativos na solução salina, além de exercerem força de adesão na superfície da placa de Petri antes de serem fixados.

Poecilia reticulata

Nestes espécimes não foram observadas lesões ou traumas aparentes durante o procedimento de necropsia. Em relação aos dois tipos de metacercárias encontradas, aquelas pertencentes à espécie *C. formosanus* estavam encistadas nas brânquias com cisto fortemente fixado e de parede rígida e coloração castanho-amarronzada. No local de adesão dos cistos, observou-se deformações localizadas nos filamentos branquiais. Ademais, em relação à espécie de *Apharyngostrigea* sp., esta estava encapsulada,

apresentando um cisto de formato oval com uma protuberância lateral, livre na cavidade de um único exemplar de *P. reticulata*.

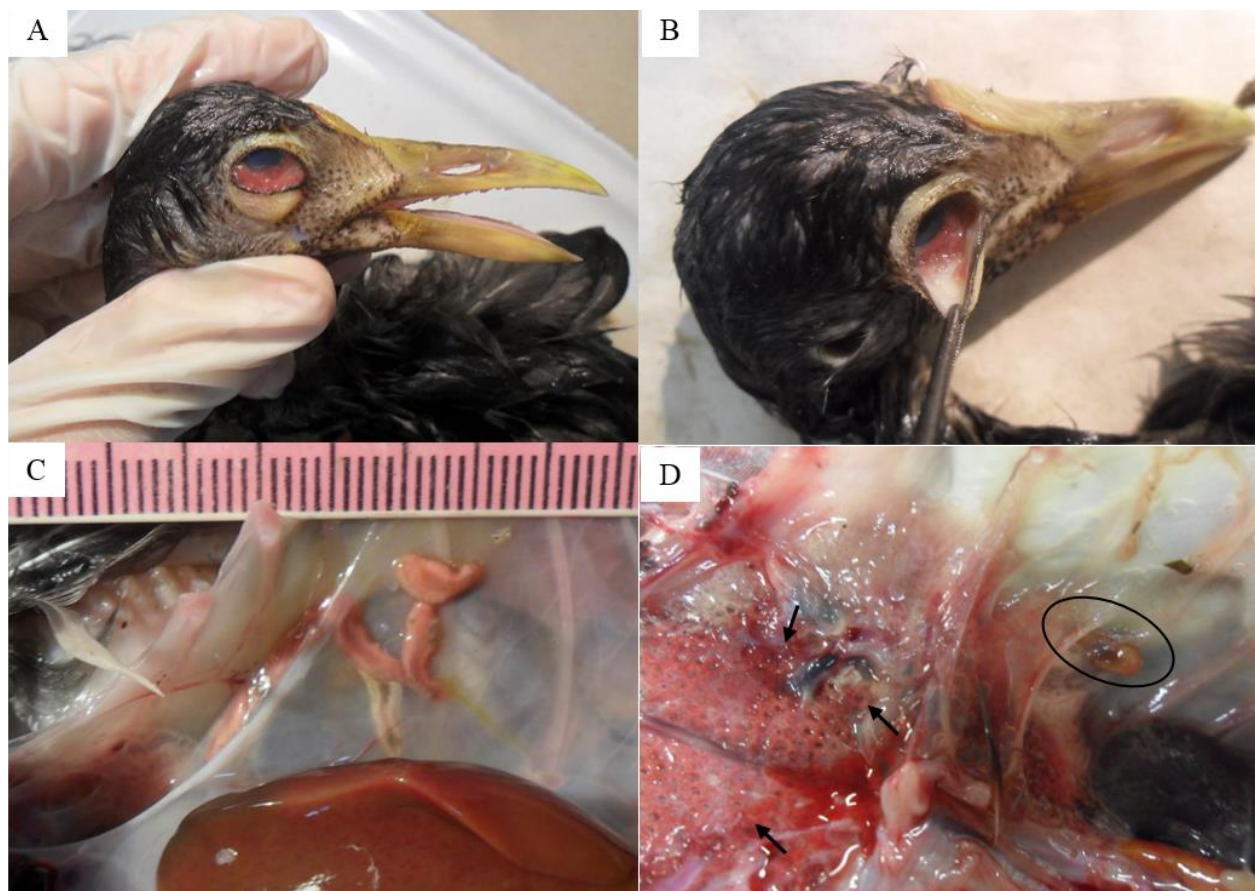
5.6.2 Achados de necropsia em *Gallinula galeata*

Durante a necropsia do frango d'água, percebeu-se que a ave estava subnutrida, com exposição do osso peitoral, sem lesões externas aparentes. Ainda na avaliação externa, foi percebido intumescência das pálpebras inferiores, com visualização de uma massa rósea no saco conjuntival ocular, sendo visualizado um aglomerado de trematódeos ainda vivos. Além disso, a córnea demonstrou opacidade, mas devido a ave ter sido encontrada em contato com a água, essa característica não pôde ser associada à infecção presente apenas com conclusões de visualização macroscópica (FIGURA 9 A). Com o proceder das ações, os trematódeos foram retirados com pinça e a mucosa exposta (FIGURA 9 B), sendo os espécimes colocados em placas de Petri com solução fisiológica, apresentando-se ativos e, após aproximadamente 10 minutos, foi possível observar com auxílio de microscópio estereoscópio uma grande quantidade de miracídios.

Após esse primeiro achado, procedeu-se com a abertura da cavidade da ave e logo que exposta, puderam ser visualizados trematódeos alongados presentes nos sacos aéreos e na superfície serosa dos órgãos, como intestino e pulmões (FIGURA 9 C). Esses trematódeos posteriormente identificados como sendo *C. mutabile* se apresentavam pouco ativos e não estavam fixados às estruturas, mas apenas em contato. Os sacos aéreos não apresentaram alterações macroscópicas. Os pulmões se apresentavam rosados, com pequenas áreas coloração avermelhada e congesta (FIGURA 9 D).

No intestino também foram recuperados trematódeos identificados como sendo *Echinostoma* sp. Após a necropsia, ao proceder com a seleção e fixação dos espécimes recuperados, percebeu-se que todos os exemplares estavam com algum grau de dano nos espinhos do colar peristômico, com ausência e rupturas, o que impossibilitou uma análise efetiva dessas estruturas e definição específica do trematódeo.

Figura 9. Achados de necropsia em *Gallinula galeata* proveniente da LCADM-MG



Legenda: A- Intumescência da pálpebra inferior com aglomerado de trematódeos e córnea com aspecto opaco. B- Observação de aglomerado de trematódeos em saco conjuntival ocular direito. C- Presença de espécimes em saco aéreo. D- Área posterior do pulmão apresentando áreas de coloração escura (setas) e presença de trematódeos em contato com a membrana serosa da cavidade (círculo).

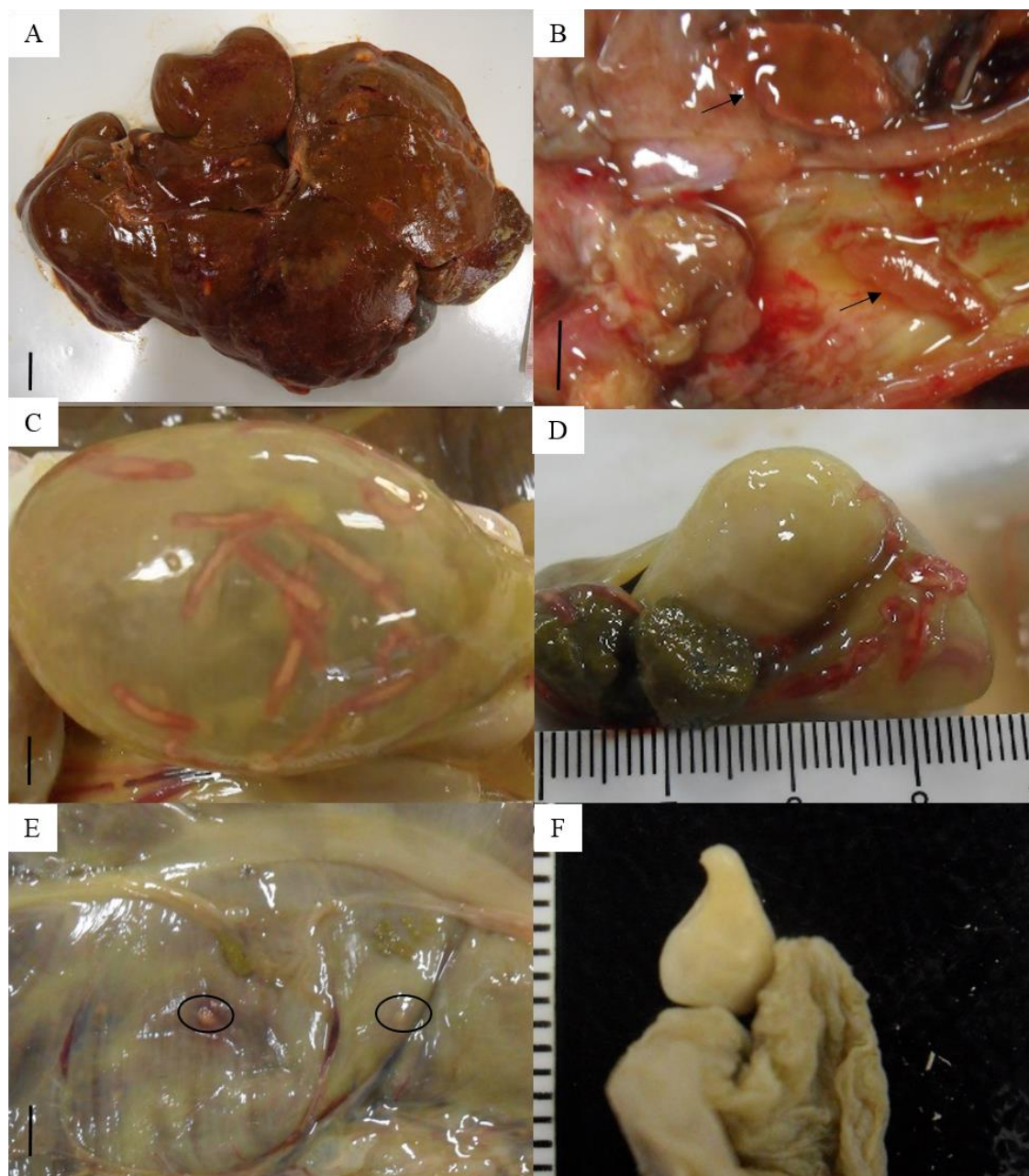
5.6.3 Achados de necropsia em *Hydrochoerus hydrochaeris*

Durante a necropsia dos dois espécimes de capivara encontrados sem vida às margens da LCADM-MG, logo após a exposição da cavidade abdominal e visualização externa dos órgãos, pôde ser percebido algumas alterações na superfície hepática, como nodulações (FIGURA 10 A), aderência às alças intestinais e ao pâncreas, além da presença de nodulações de circunferências variadas. Ao corte fluíram secreção purulenta e, à palpação e ao corte, o órgão apresentou-se mais endurecido. Ao dissecar os ductos hepáticos puderam ser visualizados trematódeos (FIGURA 10 B) que após serem coletados e processados para morfologia, foram identificados como *F. hepatica*.

Em relação ao intestino, pôde ser percebido com a exposição da cavidade abdominal, antes mesmo da secção dos órgãos, a presença de estruturas róseas e alongadas em contato com a mucosa do intestino grosso (FIGURA 10 C). Após a secção longitudinal do órgão, inúmeros exemplares de trematódeos de coloração rósea avermelhada foram visualizados em contato com a mucosa intestinal e fezes, mas não se encontravam fixados à superfície do órgão. A retirada foi realizada facilmente com auxílio de pincel. Os mesmos foram identificados como *H. hippocrepis*. É interessante mencionar que esses trematódeos foram observados a partir do momento em que o bolo fecal passou a assumir a forma típica de fezes das capivaras, com formato elíptico, no segmento do cólon transverso, estendendo-se ao cólon descendente, até a porção inicial do reto, não sendo encontrados em nenhum seguimento anterior em meio à massa amorfa de material fecal ainda em formação (FIGURA 10 D). Além disso, mesmo com o grande número de trematódeos no local, a mucosa apresentou-se íntegra, chamando atenção para seu aspecto liso-aveludado, de superfície brilhante, sem presença de muco com aspecto alterado que indicasse alguma lesão. Pôde-se notar que os parasitos ainda estavam vivos durante a necropsia, mas movimentavam-se lentamente.

Em relação a *Taxorchis* sp. recuperados do ceco, a princípio houve alguma dificuldade para a retirada pois os mesmos encontravam-se fortemente fixados à mucosa. A retirada foi realizada de forma cuidadosa para evitar o rompimento e, em alguns, a mucosa teve que ser seccionada junto ao parasito para preservação (FIGURA 10 E e F).

Figura 10. Achados de necropsia em *Hydrochoerus hydrochaeris* provenientes da LCADM-MG



Legenda: A) Fígado com superfície irregular, deposição de material fibrinoso na cápsula e áreas de coloração amarelada. B) Ducto hepático dissecado evidenciando *Fasciola hepatica* (seta preta). C e D) Cólon transverso- espécimes de *Hippocrepis hippocrepis* em contato com mucosa. E) Ceco- face externa evidenciando nodulações esbranquiçadas como sítio de aderência de (círculo preto). F) *Taxorchis* sp. fortemente fixado à mucosa, com observação de porção anterior mais afilada e porção posterior larga -acetábulo-. Escalas. A- 20mm, B e C- 5mm, E- 10mm.

5.7 Estudo morfológico e molecular dos trematódeos digeneicos

5.7.1 Trematódeos da Ordem Diplostomida

No presente estudo, puderam ser identificados seis espécies dessa ordem, analisados por metodologias morfológicas e moleculares, sendo três exclusivamente na forma de cercárias (Crassiphialinae gen. sp., Diplostomidae gen. sp., *Hysteromorpha* sp.), duas na forma de metacercárias em hospedeiros vertebrados (*Clinostomum* sp., *Tylodelphys* sp.) e uma espécie identificada na forma de cercária e metacercária no molusco transmissor (*Cotylurus* sp.).

5.7.1.1 *Clinostomum* sp. (Schistosomatoidea: Clinostomidae)

Resenha taxonômica

Forma evolutiva: metacercária.

Primeiro hospedeiro intermediário: não identificado.

Segundo hospedeiro intermediário: *Australoheros* sp. (*post mortem*).

Número de espécimes avaliados: 38.

Número de espécimes infectados: 27.

Prevalência: 71% (27/38).

Intensidade média de infecção: 10 trematódeos.

Sítio de infecção: crânio (opérculo, base das brânquias, palato, seios cranianos).

Hospedeiro definitivo: não identificado.

Morfologia

Metacercárias (N=20): corpo encapsulado em cisto maleável, coloração esbranquiçada. O desencistamento é prático se utilizado estiletos ou água à 40°C, sendo as formas livres muito ativas em meio com solução salina (FIGURA 11 A). Corados e montados em lâminas permanentes: corpo alongado, mais largo na metade posterior (FIGURA 11 B). Ventosa oral subterminal, colar oral no entorno da ventosa oral. Faringe pequena, de difícil diferenciação. Bifurcação intestinal no terço anterior do corpo, cecos lisos até a linha posterior da ventosa ventral, passando a alargar-se com formação acentuada de divertículos, estendendo-se até a extremidade posterior do corpo, onde se encontram, mas não se unem. Ventosa ventral desenvolvida na região mediana da porção anterior. Estruturas reprodutivas localizadas na região mediana da porção posterior do corpo,

intercecais. Testículos lobulados, sendo o anterior localizado mais à esquerda. Ovário pequeno, ovalado transversalmente a arredondado, entre os testículos e logo abaixo da bolsa do cirro. Bolsa do cirro em forma de meia lua, robusta, com poro genital presente em sua maioria na linha mediana do testículo anterior ou pouco antes, nunca abaixo do mesmo (FIGURA 11 C). Tegumento com presença de espinhos a partir da linha mediana posterior da ventosa ventral, sendo mais acentuado no terço final do corpo (FIGURA 11 D). Os dados morfométricos de algumas metacercárias são apresentados na TABELA 10, assim como as medidas de metacercárias de *Clinostomum* com definição específica já descritas no país, na América do Norte e Europa.

Observações: Trematódeos da família Clinostomidae Lühe, 1901, apresentam ciclo de vida envolvendo três hospedeiros, sendo moluscos os primeiros hospedeiros intermediários, onde ocorre a reprodução assexuada; peixes, répteis e anfíbios como segundos hospedeiros intermediários, com formação de metacercárias e, como hospedeiros definitivos, têm-se registrado aves, répteis e mamíferos, onde ocorre a reprodução sexuada. Apresenta distribuição cosmopolita. Como diagnose para o gênero, estes trematódeos apresentam corpo robusto, linguiforme, com posição da bolsa do cirro e poro genital pré-testicular ou lateral ao testículo anterior (KADEV, RADEV & FRIED, 2005a). As metacercárias assemelham-se aos adultos, exceto pela imaturidade dos órgãos sexuais (CAFFARA *et al.*, 2011; SERENO-URIBE *et al.*, 2018), estando os dados aqui apresentados condizentes com aqueles consultados na literatura.

Figura 11. Metacercária de *Clinostomum* sp. obtida de *Australoheros* sp.



Legenda: A) Espécime *in vivo*. B) Espécime corado e montado em lâmina permanente. Corpo: ventosa oral, colar oral na porção anterior, ventosa ventral desenvolvida, cecos laterais e complexo reprodutivo na região mediana. C) Detalhe do cirro em forma de meia lua com abertura do poro genital na região pós equatorial do testículo anterior. D) Tegumento com espinhos no terço final do corpo. Escalas: A- 500 μ m, B- 1mm, C- 100 μ m, D- 50 μ m.

Tabela 10. Dados morfométricos obtidos de metacercárias do gênero *Clinostomum* sp. recuperadas de *Australoheros* sp. provenientes da LCADM-MG e dados reportados de metacercárias de distintas espécies e autores. Dados apresentados em micrometros, exceto quando indicado de outra forma

Espécie		<i>Clinostomum</i> sp.	<i>C. heluans</i>	<i>C. "complanatum"</i>	<i>C. marginatum</i>	<i>C. dendrucatum</i>
Hospedeiro		<i>Australoheros</i> sp.	<i>Cichla temensis</i>	<i>Rhamdia quelen</i>	Vários	<i>Synbranchus marmoratus</i>
Localidade		Brasil	Brasil	Brasil	EUA	Brasil
Referência		Presente estudo	Vicente <i>et al.</i> , 1978	Vianna <i>et al.</i> , 2003	Caffara <i>et al.</i> , 2011	Acosta <i>et al.</i> , 2016
Corpo mm	C	3,77 ± 0,6 (2,8-5)	2,0-2,2	4,92 (3,05-7,38)	5,4 ± 0,67 (4,21-6,3)	8,44 ± 0,53 (8,02-9,2)
	L	1,47 ± 0,19 (1,18-1,78)	0,64-0,74	1,05 (780-1,47)	1,33 ± 0,17 (979-1,53)	3,41 ± 0,20 (3,2-3,69)
Ventosa oral	C	236 ± 37 (156-291)	120-150	191 (130-222)	312 ± 104 (238-599)	383 ± 43 (316-405)
	L	263 ± 25 (206-305)	120-140	255 (193-285)	290 ± 11 (194-586)	433 ± 8 (422-441)
Ventosa ventral	C	720 ± 47 (619-783)	200-420	603 (460-750)	669 ± 64 (510-757)	1041 ± 22 (1021-1073)
	L	715 ± 55 (619-837)	230-290	603 (460-730)	708 ± 60 (571-804)	1096 ± 44 (1050-1149)
Bolsa do cirro	C	233 ± 40 (149-284)	-	334 (127-530)	256 ± 48 (172-343)	649 ± 41 (604-685)
	L	134 ± 27 (85-191)	-	143 (82-290)	137 ± 14 (119-153)	200 ± 18 (180-226)
Testículo	C	212 ± 60 (142-355)	56	311 (135-550)	307 ± 53 (231-413)	498 ± 131 (359-655)
Anterior	L	291 ± 46 (213-390)	84-120	345 (180-550)	389 ± 77(264-498)	1113 ± 151 (890-1266)
Testículo	C	203 ± 47 (120-276)	56	307 (148-440)	327 ± 57 (233-457)	601 ± 77 (528-708)
Posterior	L	406 ± 66 (305-553)	84-120	362 (180-510)	405 ± 56 (295-492)	1020 ± 202 (802-1318)
Ovário	C	104 ± 18 (71-142)	50-110	143 (83-118)	115 ± 16 (85-142)	186 ± 18 (157-206)
	L	113 ± 22 (71-156)	90-150	118 (55-220)	80 ± 13 (62-97)	131 ± 21 (103-156)

L- largura, C- comprimento, (-) não mencionado.

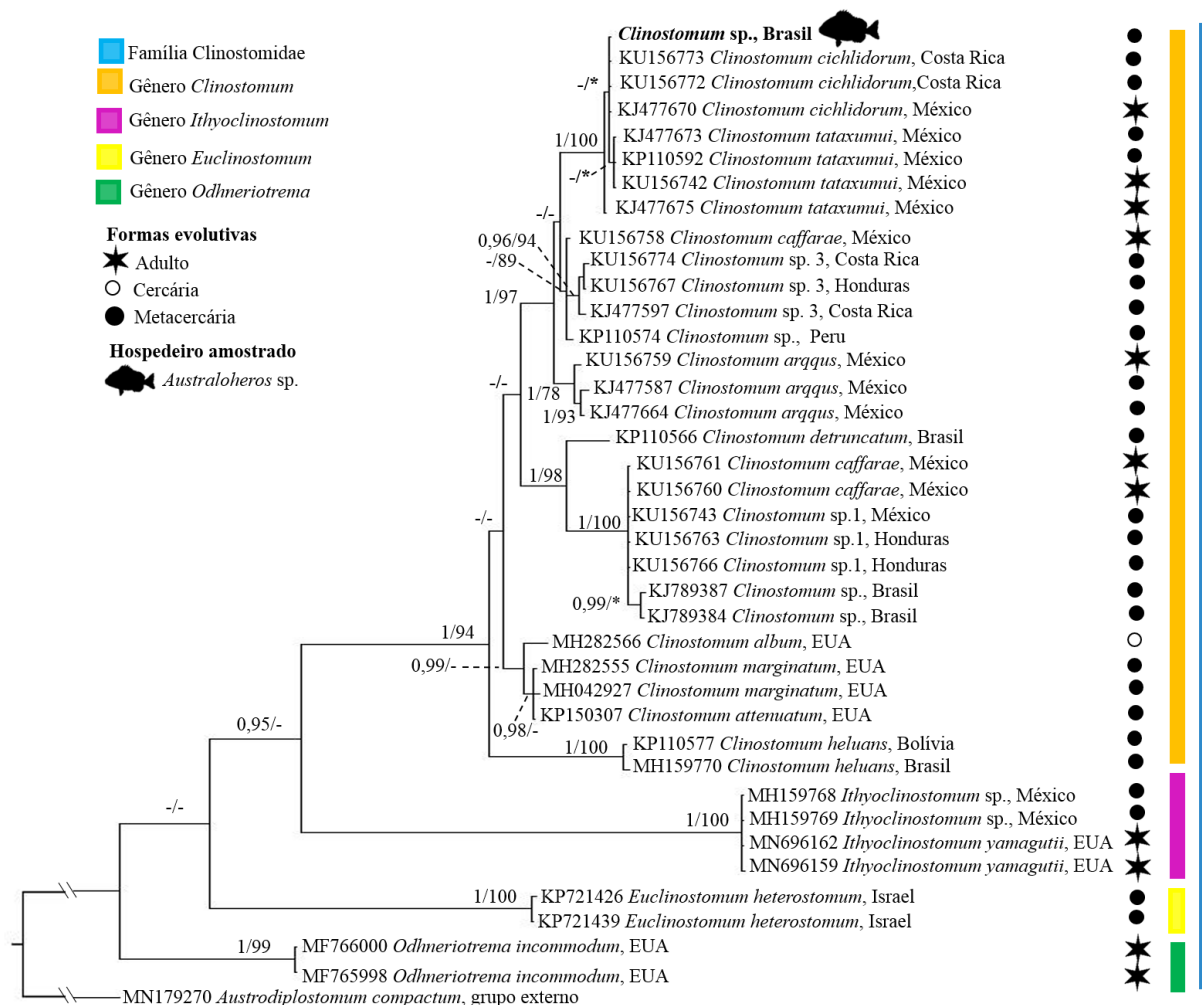
Biologia molecular

Na análise molecular das metacercárias de *Clinostomum* sp. reportadas no presente estudo foram utilizados dois marcadores ribossomais (28S e ITS) e o marcador mitocondrial COI. Com o marcador 28S (1152 pb, 20 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: GTR+G), verificou-se divergências moleculares entre 0-3,75% em relação a outras 10 espécies do gênero (14 sequências). Dentre elas, houve similaridade de 100% com *C. tataxumui* (MF398320-21) e *C. cichlidorum* (MH159727), recentemente descritas no México. Divergências de até 2,68% foram verificadas em relação às outras espécies reportadas no continente americano (1,93% *C. poteae*, EUA: MH282568; 2,25% *C. marginatum*, EUA e México: MF398323 e KU708007; 2,47% *Clinostomum* sp., México e 2,68% *C. album*, EUA). Em contraponto, isolados de *Clinostomum* spp. de outros continentes tiveram estes valores acima de 2,79%). Considerando-se espécies de outros dois gêneros da família, as divergências foram 6,11 para *Odhneriotrema incommodum* MN696161: EUA e 8,36% para *Ithyoclinostomum yamagutii*, MN696162: EUA). Na análise filogenética, pôde-se observar a formação de um clado bem suportado (1 IB/ 94 MV) contendo as espécies do gênero *Clinostomum*, seguido de um particionamento em relação as espécies primeiramente do Novo Mundo e do Velho Mundo com alto valor de suporte. Em relação ao isolado de *Clinostomum* do presente estudo, este se agrupou (1IB/ 100 MV) junto às sequências de *C. tataxumui* e *Clinostomum* sp., ambas provenientes do México (FIGURA 12).

Com o marcador ITS (931 pb, 38 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: K2+G), foi realizada a comparação com 13 espécies de *Clinostomum* (29 sequências) do continente americano, e 3 espécies de outros gêneros da família Clinostomidae. Como resultado, *Clinostomum* sp. do presente estudo apresentou 100% de similaridade com isolados de *C. tataxumui* e *C. cichlidorum*. Considerando-se outras espécies registradas no continente americano, o percentual de divergencia variou entre 1,3% e 4,7%. Um isolado identificado como *Clinostomum* sp. 4, previamente obtidos na mesma localidade (Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte), apresentou divergência de 4,7%. Na comparação com outros gêneros da família Clinostomidae, a divergência molecular esteve entre 12,79% e 15,4%. Na análise filogenética, um clado bem suportado (1 IB/ 94 MV) contendo as espécies do gênero *Clinostomum* foi observado. O isolado do presente estudo se agrupou em um clado com alto valor de suporte (1 IB/ 100 MV) *C. tataxumui* e *C. cichlidorum* da Costa Rica e México (FIGURA 13).

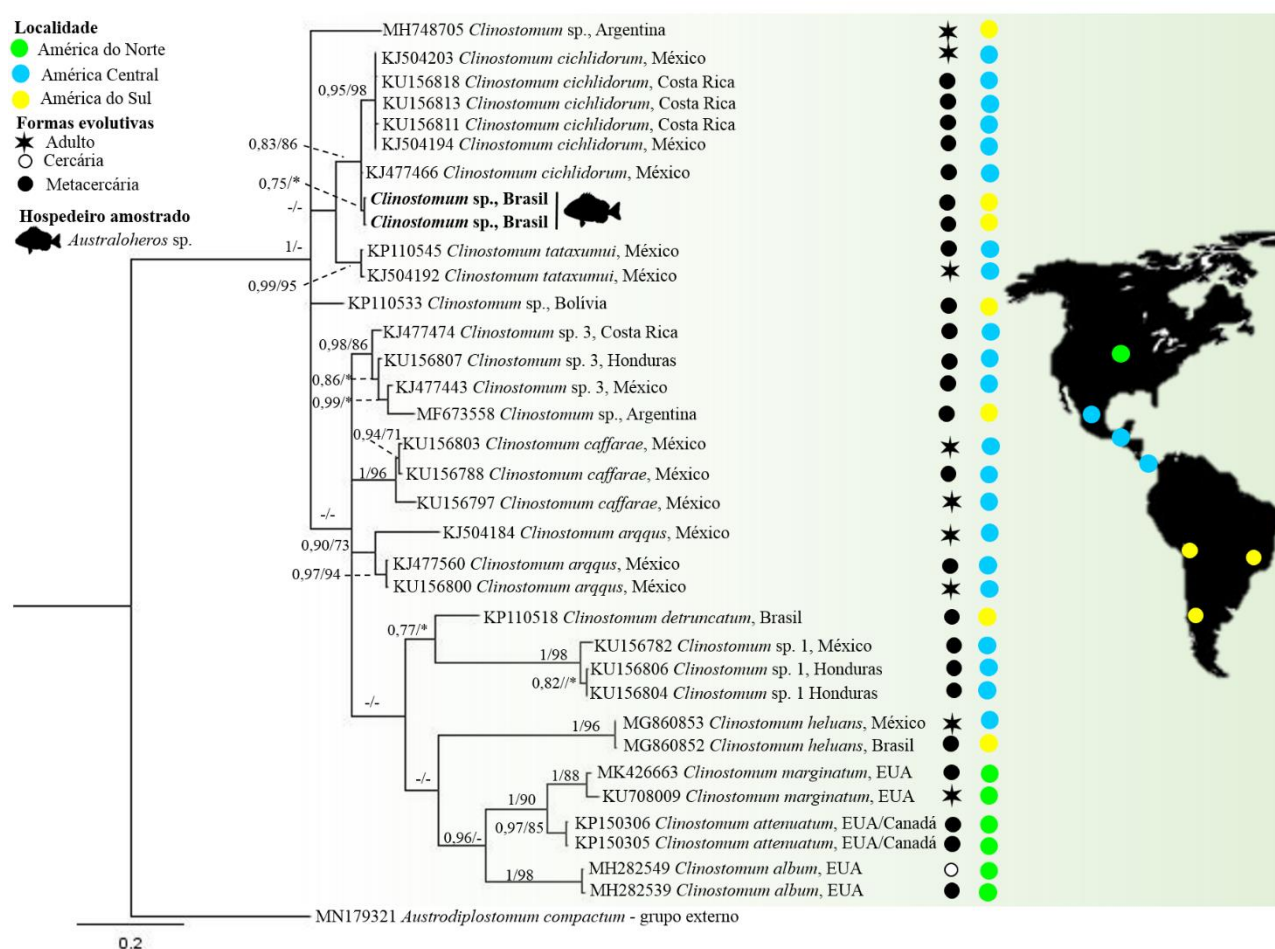
Por fim, na análise molecular com o marcador COI (496 pb, 35 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: TN93+G), foram utilizadas duas sequências provenientes de 2 metacercárias do presente estudo e na comparação pareada houve similaridade de 100% entre as mesmas, demonstrando coespecificidade. Ao ser comparado com outras espécies do gênero *Clinostomum* observou-se divergências que variaram entre 3,2% a 17,90%. As maiores similaridades foram observadas em relação a *C. cichlidorum* (3,27-3,71%), *C. tataxumui* (7,64%) e um isolado de metacercária da Bolívia (8,95%, KP110533). Todas as demais espécies apresentaram divergências superiores a 10%. Na análise filogenética, *Clinostomum* do presente estudo, se agrupou com *C. cichlidorum* da Costa Rica e do México (0,83 IB/ 86 MV), formando posteriormente uma linhagem independente com as duas sequências, porém, com suporte de baixo valor (FIGURA 14).

Figura 13. Árvore filogenética (Inferência Bayesiana) gerada com utilização de sequências dos alinhamentos de DNA ribossomal ITS de clinostomídeos



Legenda: Filograma gerado a partir da análise de Inferência Bayesiana. Os suportes nodais para Inferência Bayesiana foram considerados aqueles iguais ou acima de 90 e, para Máxima Verossimilhança, considerados valores de suporte igual ou acima de 70. Asteriscos referem-se a nodos inexistentes na análise por Máxima Verossimilhança. Em negrito encontram-se as sequências do presente estudo.

Figura 14. Árvore filogenética (Inferência Bayesiana) gerada a partir de seqüências dos alinhamentos de DNA mitocondrial Citocromo Oxidase de trematódeos do gênero *Clinostomum* das Américas



Legenda: Filograma gerado a partir da análise de Inferência Bayesiana. Os suportes nodais para Inferência Bayesiana foram considerados aqueles iguais ou acima de 90 e, para Máxima Verossimilhança, considerados valores de suporte igual ou acima de 70. Asteriscos referem-se a nodos inexistentes na árvore filogenética com utilização do método de Máxima Verossimilhança. Em negrito encontram-se as seqüências do presente estudo.

5.7.1.2 *Cotylurus* sp. (Diplostomoidea: Strigeidae)

Resenha taxonômica

Forma evolutiva: cercária e metacercária.

Primeiro hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Segundo hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Tipo cercariano: Distoma longifurcada faringeada (Estrigeocercária), metacercária do tipo *Tetracotyle*.

Prevalências: em relação à forma cercariana- 0,21% no total de moluscos (4/1.861) e 1,45% (4/275) entre os moluscos infectados;

Em relação à forma metacercária intramolusco- 1,88% no total de moluscos (35/1.861) e entre os espécimes de *B. straminea* infectados de 12,72% (35/275) (coletas regulares).

Hospedeiro definitivo: provavelmente anatídeos domésticos.

Morfologia

Cercárias (FIGURA 15 A): *in vivo* são larvas ativas, emergindo após fotoestimulação artificial, sem encistamento nas placas de poliestireno. Corpo cercariano anterior à cauda, porção anterior apresentando pequenos espinhos. Ventosa oral subterminal, pré faringe pequena, faringe muscular. Ventosa ventral presente e desenvolvida na região mediana do corpo. Glândulas de penetração pós acetabular. Corpo da cauda mais curto que as furcas.

Metacercárias (FIGURA 15 B): são do tipo *Tetracotyle*, encontradas intramolusco, de formato piriforme, específico da família Strigeidae.

Biologia molecular

Foram utilizados dois marcadores ITS (1236 pb, 31 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: K2+G) e COI, foi possível associar a forma cercariana observada anteriormente ao estudo na localidade à forma evolutiva metacercária, pois suas sequências apresentaram 100% de similaridade entre as mesmas, além de pertencer ao gênero *Cotylurus* sp., identificadas quando comparadas a outras sequências de espécies desse gênero depositadas no *GenBank*, com similaridade acima de 94,8% e 95,6% (ITS) com *C. strigeoides* e *C. marcogliesei*, oriundos do México e Canadá, respectivamente. Além disso, ao comparar com outras espécies do mesmo gênero utilizando o marcador COI, houve diferenças interespecíficas que variaram entre 8,8 a 12,5%. Os resultados obtidos fizeram parte de um artigo publicado sobre espécies da

superfamília Diplostomoidea presentes no Brasil (LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). *Observações:* Trematódeos desse gênero tem como hospedeiros intermediários os moluscos gastrópodes (primeiro e segundo hospedeiro), com emergência da forma cercariana e encistamento intramolusco, sendo a infecção do hospedeiro definitivo (pássaros de hábito aquático das famílias Anatidae, Charadriidae e Scolopacidae) possível pela ingestão do invertebrado infectado (BASCH, 1969). Ressalta-se também que os locais de encontro dos moluscos infectados são os mesmos de convivência dos anseriformes (Ponto de coleta A e B).

5.7.1.3 Crassiphialinae gen. sp. (Diplostomoidea: Diplostomidae)

Resenha taxonômica

Forma evolutiva: cercária

Primeiro hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Tipo cercariano: Monostoma Longifurcada Faringeada.

Prevalência: 0,05% entre gastrópodes *B. straminea* (1/1.861) e entre os moluscos infectados de 0,36% (1/275) (coletas regulares).

Segundo hospedeiro intermediário: não identificado.

Hospedeiro definitivo: não identificado.

Morfologia

Cercárias (FIGURA 15 C e D): *in vivo* são larvas muito ativas, com pouca emergência após fotoestimulação artificial, sem encistamento nas placas de poliestireno. Corpo cercariano anterior à cauda, longo, ventosa oral na extremidade anterior. Pré-faringe presente, faringe muscular e esôfago longo. Cecos não observados. Dois pares de glândulas de penetração na metade posterior do corpo. Cauda presente, bifurcada, com comprimento maior que o corpo, lisa e com furca maior que a metade do tronco caudal (longifurcada).

Biologia molecular

Essa cercária foi pela primeira vez descrita no país e os dados moleculares utilizando os marcadores ITS (1228 pb, 31 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: K2+G) e COI, proporcionaram nesse momento, a identificação até o nível de subfamília com auxílio baseado na comparação com outros diplostomídeos

que contém sequências depositadas no *GenBank*. Em relação ao marcador ITS, houve similaridade com membros do gênero *Uvulifer*, entretanto, no marcador COI houve diferença de 16% com um isolado do mesmo gênero. Os resultados obtidos fizeram parte de um artigo publicado sobre espécies da superfamília Diplostomoidea presentes no Brasil (LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019).

Observações: Esses trematódeos necessitam de um segundo hospedeiro intermediário com formação de metacercárias, como exemplo, os peixes (PINTO, 2013).

5.7.1.4 Diplostomidae gen. sp.

Resenha taxonômica

Forma evolutiva: cercária

Primeiro hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Tipo cercariano: Distoma Longifurcada Faringeada (Estrigeocercária).

Prevalências: 0,05% (1/1.861) no total e de 0,36% entre os espécimes de *B. straminea* infectados (1/275) (coletas regulares).

Segundo hospedeiro intermediário: não identificado.

Hospedeiro definitivo: não identificado.

Morfologia

Cercárias (FIGURA 15 E e F): *in vivo* são larvas muito ativas, emergindo após fotoestimulação artificial, sem encistamento nas placas de poliestireno. Corpo anterior à cauda, alongado, ventosa oral subterminal, faringe musculosa e cecos que se dilatam após ventosa ventral. Ventosa ventral presente na região posterior. Cauda bifurcada com furcas longas (Longifurcada) e presença de cinco pares de corpos caudais.

Observações: Características desta cercária se assemelham aquelas pertencentes a cercárias de *Tylodelphys* sp. como, por exemplo, a presença de cinco pares de corpos caudais (ROSSER *et al.*, 2016), o que faz necessária uma avaliação posterior aprofundada. Não foram realizados estudos moleculares com este trematódeo.

5.7.1.5 *Hysteromorpha* sp. (Diplostomoidea: Diplostomidae)

Resenha taxonômica

Forma evolutiva: cercária

Hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Tipo cercariano: Distoma Longifurcada Faringeada (Estrigeocercária).

Prevalência: 0,05% (1/1.861) e de 0,36% entre os espécimes de *B. straminea* infectados (1/275) (coletas regulares).

Segundo hospedeiro intermediário: não identificado.

Hospedeiro definitivo: não identificado.

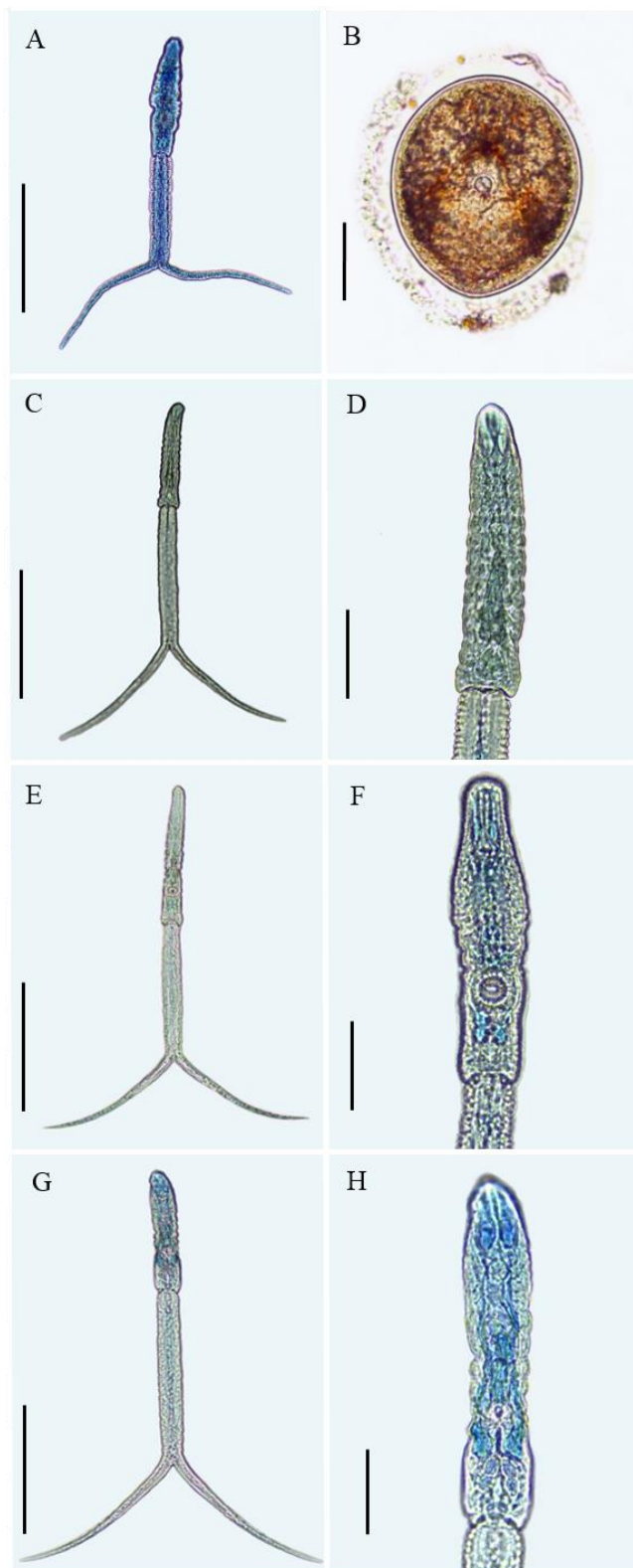
Morfologia

Cercárias (FIGURA 15 G e H): *in vivo* são larvas muito ativas, emergindo após fotoestimulação artificial, sem encistamento nas placas de poliestireno. Corpo anterior à cauda, alongado, ventosa oral subterminal, faringe musculosa. Ventosa ventral presente na região posterior do corpo, presença de glândulas de penetração pré- e pós- acetabular. Cauda bifurcada com furcas longas (Longifurcada).

Biologia molecular

Os marcadores ITS (1154 pb, 31 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: K2+G) e COI, proporcionaram auxílio na identificação até o nível de gênero após comparar com sequências já depositadas no *GenBank*. Com o marcador ITS a presente amostra agrupou com outros isolados do gênero provenientes do continente europeu e americanos (*H. triloba* e *H. corti*, respectivamente) e no marcador COI foi possível uma diferenciação interespecífica, em que isolados brasileiros diferenciaram em menos de 1%, além da observação de clados com distinção de grupos de isolados europeus (*H. triloba*), da América do Norte e Central (*H. corti*) e agrupamento dos isolados brasileiros. Os resultados obtidos fizeram parte de um artigo publicado sobre tematódeos da superfamília Diplostomoidea presentes no Brasil (LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019).

Figura 15. Formas larvais de trematódeos da superfamília Diplostomoidea obtidas de *Biomphalaria straminea* proveniente da LCADM-MG



Legenda: A) *Cotylurus* sp. B) *Cotylurus* sp. metacercária. C e D) Crassiphialinae gen. sp.- notar ausencia de ventosa ventral. E e F) Diplostomidae gen. sp. G e H) *Hysteromorpha* sp. Escalas: A, C, D, F- 200µm. B-100µm. E, F, G- 50 µm

5.7.1.6 *Tylodelphys* sp. (Diplostomidae: Diplostominae)

Resenha taxonômica

Forma evolutiva: metacercária

Primeiro hospedeiro intermediário: não identificado.

Segundo hospedeiro intermediário: *Hoplias malabaricus*.

Prevalência: 20% (1/5).

Número de trematódeos recuperados: 59 espécimes.

Sítio de infecção: cavidade craniana.

Hospedeiro definitivo: não identificado.

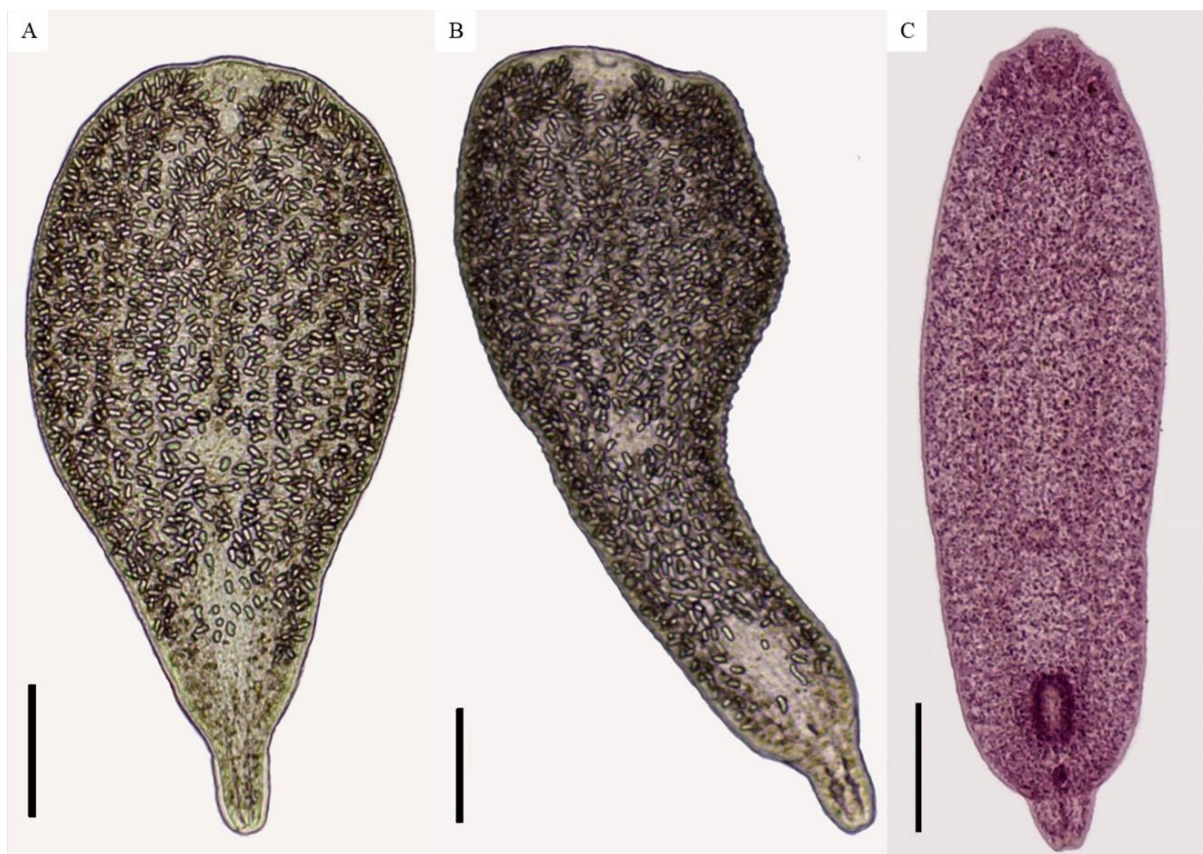
Morfologia

Metacercárias (N=20): parasitos *in vivo* extremamente ativos, apresentando movimentos vigorosos, com forte aderência à superfície, de formato piriforme e extremidade posterior cônica. Corpo repleto de pequenas granulações de formato bacilar até a região do órgão tribocítico (FIGURA 16 A e B). Quando corado e montado em lâminas permanentes, apresentam corpo em forma linguiforme, côncavo ventralmente, extremidade anterior arredondada, extremidade posterior afilada de formato cônico (FIGURA 16 C). Tegumento com ausência de espinhos e papilas. Ventosa oral subterminal, desenvolvida, maior que a ventosa ventral. Presença de pseudoventosas discretas na extremidade anterior, laterais a ventosa oral. Faringe pequena, elíptica e longitudinal. Cecos longos e lisos, com terminação na linha posterior do órgão tribocítico. Ventosa ventral arredondada, localizada na linha mediana da metade posterior, anterior ao órgão tribocítico. Órgão tribocítico desenvolvido, musculoso, de formato elíptico, longitudinal, com uma fenda central diferenciada, localizado entre a ventosa ventral e o primórdio genital. Primórdio genital localizado posterior ao órgão tribocítico (FIGURA 16 D). Os dados morfométricos são apresentados na TABELA 11, assim como outras metacercárias do mesmo gênero descritas por distintos autores.

Observações: Como nota, trematódeos diplostomídeos apresentam em seu ciclo de vida geralmente três hospedeiros, sendo o primeiro os moluscos gastrópodes onde se dá a reprodução assexuada, como segundo hospedeiro têm-se peixes, anfíbios, moluscos e anelídeos, com formação de metacercárias e, como hospedeiros definitivos, já foi registrada a infecção em aves, mamíferos e répteis, onde ocorre a reprodução sexuada (GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017).

No presente estudo, não foi possível identificar o molusco transmissor e o hospedeiro definitivo. Como caracteres de diagnose, *Tylodelphys* Diesing, 1850, apresenta assim como demais diplostomídeos a presença de um órgão de fixação denominado “órgão tribocítico”, sendo neste gênero com formato oval (NIEWIADOMSKA, 2005; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017). Características como: corpo linguiforme, indistintamente bipartido, ventosas oral e ventral pequenas, com pseudoventosas presentes e laterais a ventosa oral diagnose do gênero (NIEWIADOMSKA, 2005), sendo dados que corroboram com a identificação morfológica apresentada no presente estudo.

Figura 16. Metacercárias de *Tylodelphys* sp. obtidas de *Hoplias malabaricus* proveniente da LCADM-MG



Legenda: A) Espécime *in vivo* em repouso. B) Espécime *in vivo* estendido. C) Espécime corado e montado em lâmina permanente. Observar presença de pseudosulcos nas laterais da ventosa oral em B e C. Escalas: 100 μ m.

Tabela 11. Dados morfométricos obtidos de metacercárias do gênero *Tylodelphys* sp. recuperadas de *Hoplias malabaricus* provenientes da LCADM-MG e dados reportados de espécies por diferentes autores. Medidas em micrômetro.

Espécie		<i>Tylodelphys</i> sp.	<i>Tylodelphys</i> sp.	<i>Tylodelphys kuerepus</i>	<i>Tylodelphys</i> sp.
Hospedeiro		<i>Hoplias malabaricus</i>	<i>Gobiomorphus cotidianus</i>	<i>Chirostoma jordani</i>	<i>Hoplias malabaricus</i>
Localidade		Minas Gerais, Brasil	Nova Zelândia	México	São Paulo, Brasil
Referência		Presente estudo	Blasco-Costa <i>et al.</i> , 2017	Sereno-Uribe <i>et al.</i> , 2019	Pelegri <i>et al.</i> , 2019
Sítio infecção		Cavidade craniana	Olho	Cavidade craniana	Olho e cavidade corporal
Corpo	C	597 ± 34 (539-673)	1118 ± 167 (858-1374)	1168 (1027-1247)	684 ± 79 (551-1033)
	L	175 ± 14 (149-206)	315 ± 54 (223-429)	350 (313-386)	151 ± 26 (90,5-195)
Ventosa oral	C	43 ± 3 (39-50)	61 ± 5 (52-65)	49 (42-56)	33 ± 9 (10,5-54)
	L	41 ± 4 (36-50)	55 ± 7 (41-73)	38 (25-45)	32 ± 10 (14,5-55,5)
Faringe	C	21 ± 4 (12,5-26,8)	43 ± 7 (32-57)	40 (36-49)	25 ± 2 (23-27,7)
	L	14 ± 4 (10,7-25)	32 ± 7 (19-49)	19 (15-25)	30 ± 7 (23,5-36,8)
Esôfago	C	-	46 ± 22 (8-77)	-	-
Ventosa ventral	C	25 ± 4 (19,6-35,7)	67 ± 7 (55-78)	57 (52-64)	36 ± 10 (20,8-66)
	L	30 ± 4 (25-39)	68 ± 10 (51-98)	55 (46-65)	10 (16,9-52,6)
Órgão	C	56 ± 5 (45-71,4)	153 ± 26 (113-220)	142 (129-169)	93 ± 17 (71,2-144,8)
Tribocítico	L	34 ± 3 (26,8-39,2)	89 ± 20 (63-134)	74 (67-87)	30 ± 7 (23,5-36,8)

C-comprimento. L- largura.

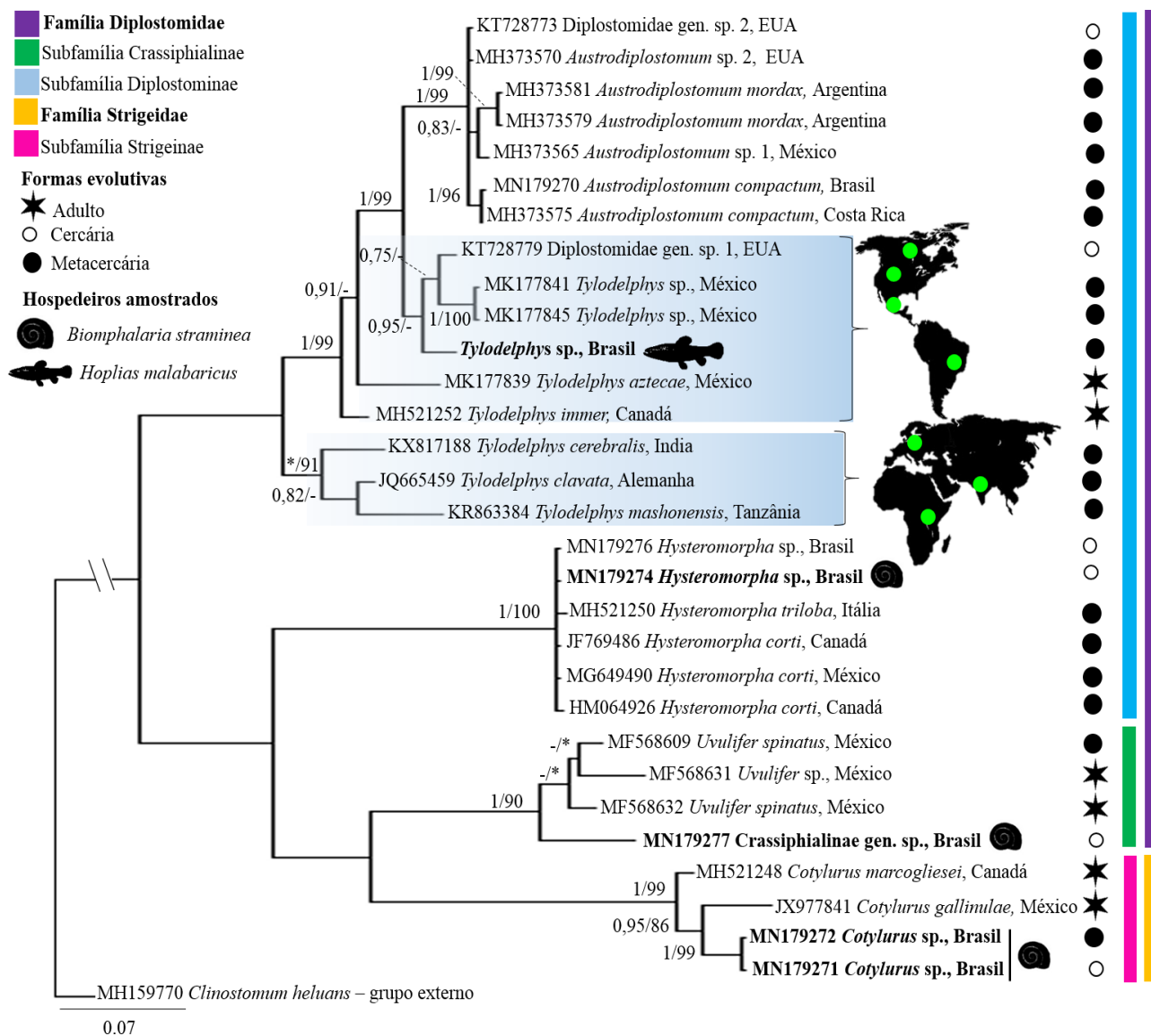
Biologia molecular

Foram utilizados dois marcadores para a análise deste isolado, sendo os ribossomais 28S e ITS. Nas análises com utilização do marcador 28S (1024 pb), não foi possível obter informações com relevância em relação ao isolado de *Tylodelphys* do presente estudo. Neste aspecto, o mesmo teve similaridade de 99,5% com cercárias identificadas como Diplostomidae gen. sp. 1 obtidas de *B. havanensis* provenientes dos EUA (ROSSER *et al.*, 2016). Divergências moleculares que variaram entre 1,6 e 1,9% foram observadas em relação a *T. azteca* e *T. immer*. Valores ligeiramente inferiores foram verificados em relação a membros do gênero *Austrodiplostomum* (1,4-1,5%).

Já com o marcador ITS (993 pb, 31 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: K2+G), a metacercária de *Tylodelphys* sp. isolada no presente estudo teve maior similaridade com cercárias Diplostomidae do tipo 1 já mencionadas anteriormente (98,7%). A variação interespecífica variou entre 1,7e 7,2% em relação a *Tylodelphys* sp. 6, *T. cerebralis* e *T. mashonensis* isolados do México, Índia e Tanzânia, respectivamente. Considerando-se as espécies do gênero *Austrodiplostomum* (*Austrodiplostomum* sp. 2, *Austrodiplostomum compactum*, *Austrodiplostomum* sp. 1, e *A. mordax*), a diferença molecular variou entre 2,1 e 2,4 %. Já na análise filogenética, foi possível observar a diferenciação de membros do gênero *Tylodelphys* e *Austrodiplostomum* com formação de dois clados distintos e bem suportados entre estes gêneros (1 IB/ 99 ML), assim como outro agrupamento com haplótipos do gênero *Tylodelphys* provenientes do Velho Mundo, demonstrando ser uma categoria taxonômica parafilética (FIGURA 17), o que demanda estudos futuros. Além disso, o espécime aqui apresentado agrupou no mesmo clado com uma cercária de Diplostomidae do tipo 1 e com dois isolados de *Tylodelphys* sp. advindos do México, com altos valores de suporte (1 BI/ 99 MV).

Tentativas de se obter sequências do gene COI utilizando-se os primers PlatDiplo COX1F/ COX1R e DICE-1/ DICE-11 não lograram em sucesso.

Figura 17. Árvore filogenética gerada com utilização de DNA ribossomal ITS de trematódeos da superfamília Diplostomoidea proveniente da LCADM-MG



Legenda: Filograma gerado a partir da análise de Inferência Bayesiana. Os suportes nodais para Inferência Bayesiana foram considerados aqueles iguais ou acima de 90 e, para Máxima Verossimilhança, considerados valores de suporte igual ou acima de 70. Asteriscos referem-se a nodos inexistentes na árvore filogenética com utilização do método de Máxima Verossimilhança. Em negrito encontram-se as sequências do presente estudo.

5.7.2 Trematódeos da Ordem Plagiorchiida La Rue, 1957

Nesta ordem foram abordados morfológicamente e molecularmente oito trematódeos. Destes, cinco pertencem à Superfamília Echinostomatoidea, ao qual, três foram identificados em sua forma adulta (*C. mutabile*, *Echinostoma* sp. e *F. hepatica*) e dois identificados tanto no molusco transmissor, quanto no hospedeiro definitivo, no último caso, as aves (*T. cucumerinum* e *P. gralli*). Além destes, dois trematódeos recuperados pertencem à Superfamília Paramphistomoidea, sendo *Z. lunata* identificado em sua forma larval e, por experimentação, a obtenção do espécime adulto, além de *Taxorchis* sp. recuperado de capivara. Ademais, *H. hippocrepis* pertencente à Superfamília Pronocephaloidea pôde ser identificado tanto em suas formas larvais em *B. straminea*, quanto na sua forma adulta oriundo de capivaras.

5.7.2.1 *Cyclocoelum mutabile* (Zeder, 1800) (Echinostomatoidea: Cyclocoelidae)

Resenha taxonômica

Forma evolutiva: adulto.

Hospedeiro intermediário: não identificado.

Hospedeiro definitivo: *Gallinula galeata*.

Número de trematódeos recuperados: 24 espécimes.

Sítio de infecção: sacos aéreos e cavidade.

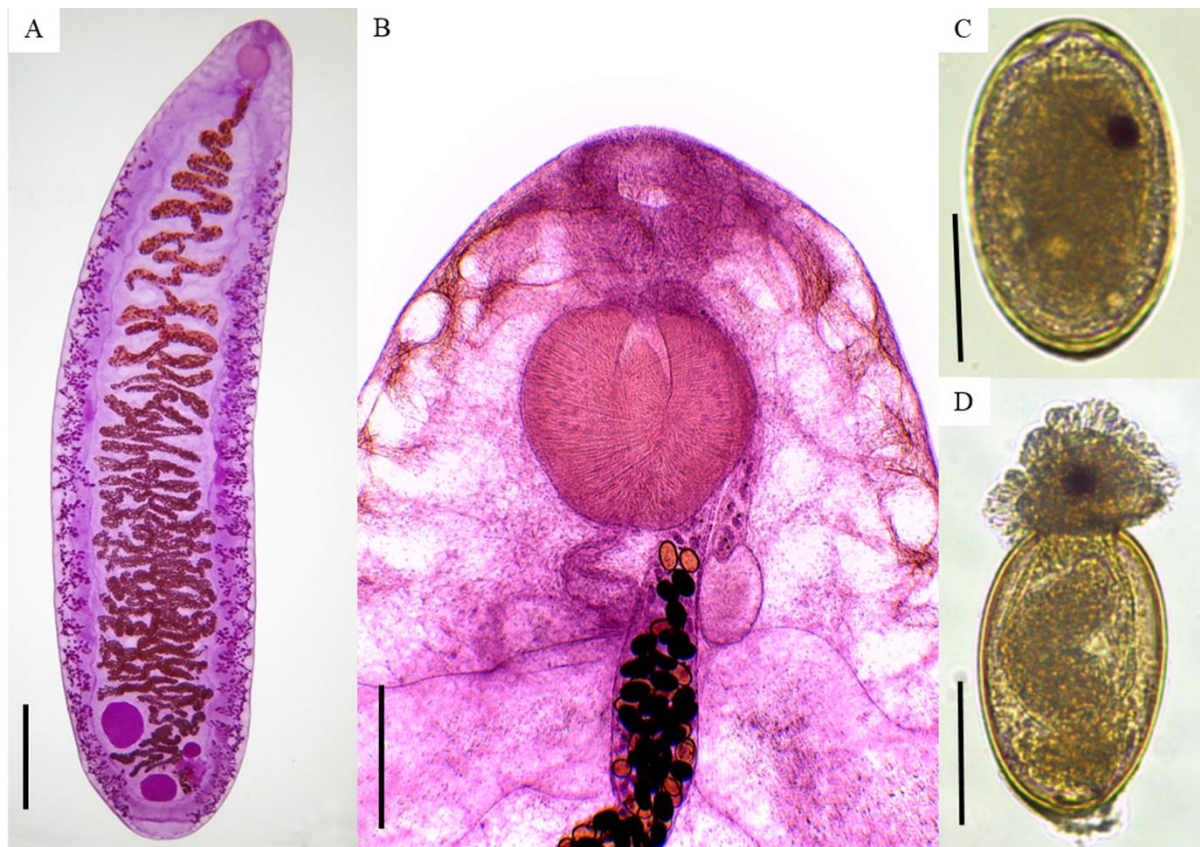
Morfologia

Adultos (N=10) (FIGURA 18 A): *in vivo* apresentam coloração rósea-acastanhada, pouco ativos, de fácil retirada com pincéis. Corados e montados em lâminas permanentes apresentam corpo alongado, lanceolado, tegumento liso. Abertura oral subterminal, com ausência de ventosa. Pré-faringe curta, faringe musculosa e desenvolvida. Esôfago curto e afilado, geralmente com uma curvatura antes da bifurcação (FIGURA 18 B). Cecos sem presença de divertículos, unindo-se próximos à extremidade posterior do corpo. Presença de dois testículos no quarto posterior, intercecal, de forma arredondada a ovalada transversalmente em posição oblíqua. Bolsa do cirro pouco desenvolvida, localizada no quarto anterior logo acima da bifurcação cecal, estendendo-se lateralmente à faringe, com abertura do poro genital localizado na porção pré-faringe. Vesícula seminal localizada no interior do saco do cirro, de difícil diferenciação na maioria dos espécimes. Vitelária folicular, cecais e extracecais, estendendo-se desde a segunda metade anterior, até o

quarto posterior, sem unirem-se. Ductos vitelínicos prolongam-se a partir das vitelárias no quarto posterior do corpo, sendo que o ducto esquerdo se alonga pela borda dorsal do testículo posterior, unindo-se ao direito em um único canal, na região da glândula de Mehlis e complexo reprodutivo. Ovário esférico, localizado lateralmente (lado direito) na região intertesticular, com a glândula de Mehlis e complexo reprodutivo logo abaixo. O útero apresenta curvaturas sinuosas, preenchendo a maior parte da região intercecal, projetando-se desde à borda dorsal do testículo posterior, até a região do quarto anterior onde desemboca o poro genital. *Ovos*: formato elíptico, operculados, coloração amarela, larvados (FIGURA 18 C). Miracídios com presença de ocelo, contendo em seu interior uma rédia (FIGURA 18 D). Os dados morfométricos foram comparados a outros espécimes de *C. mutabile* em distintos hospedeiros e localidades, sendo apresentado na TABELA 12.

Observações: Como nota, trematódeos da família Cyclocoelidae Stossich, 1902, apresentam em seu ciclo de vida a presença de dois hospedeiros, sendo o primeiro um molusco gastrópode, onde ocorre a reprodução assexuada, com produção de cercarias não emergentes e posterior formação de metacercárias no próprio molusco; os hospedeiros definitivos infectam geralmente aves, onde ocorre a reprodução sexuada (TRAVASSOS, 1950; MCLAUGHLIN, 1976; MCLAUGHLIN, 1986; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). Como caracteres de diagnose, o gênero *Cyclocoelum* Brandes, 1892 apresenta a fusão do ceco na extremidade posterior, testículos com posição oblíqua, com forma triangular da posição dos testículos junto ao ovário, ramos uterinos intercecais, separados posteriormente (KANEV, RADEV & FRIED, 2005b). Como caracteres para diagnose da espécie, há a ausência de ventosa oral, assim como abertura do poro genital na pré-faringe em *C. mutabile* (DRONEN & BLEND, 2015; LÓPEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2018b). Estas características estão de acordo com a identificação apresentada no presente estudo.

Figura 18. *Cyclocoelum mutabile* recuperado de *Gallinula galeata* infectado naturalmente, proveniente da LCADM-MG



Legenda: A) Espécime adulto. B) Extremidade anterior evidenciando ventosa oral seguida de faringe e bolsa do cirro circundando a lateral direita da faringe, poro genital na pré-faringe. C) Ovo com larva formada. D) Miracídio no momento da eclosão evidenciando exteriorização pelo opérculo e rédia ainda no interior do ovo. Escalas: A- 2mm, B- 500 μ m, C e D- 50 μ m.

Tabela 12. Dados morfométricos obtidos de *Cyclocoelum mutabile* recuperados de *Gallinula galeata* da LCADM-MG e dados reportados do trematódeo por diferentes autores. Dados apresentados em micrometros (exceto quando indicado de outra forma). C: Comprimento. L: Largura.

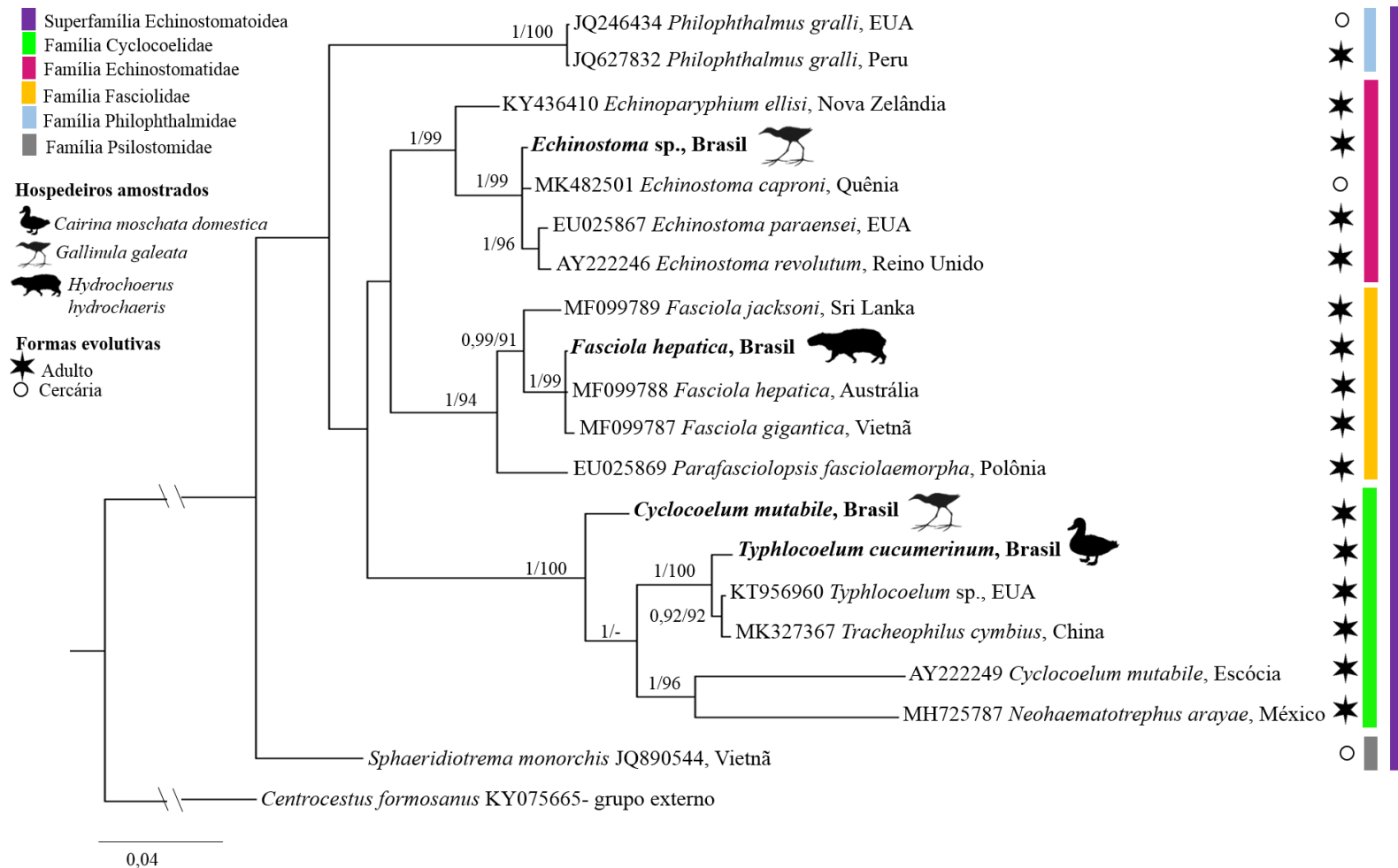
Hospedeiro		<i>Gallinula galeata</i>	<i>G. galeata</i>	<i>Fulica atra</i>	<i>G. galeata</i>	<i>Tringa semipalmata</i>
Localidade		Brasil	Brasil	Tovačov, República	Lima, Peru	La Paz, México
Referência		Presente estudo	Fernandes, 1976	Sitko <i>et al.</i> , 2017	Gomez-Puerta <i>et al.</i> , 2018	López-Jiménez <i>et al.</i> , 2018
Parâmetros		N= 10	N=7	N=30	N= 4	N=7
Corpo mm	C	15,2 ± 5,6 (13-18,5)	13,6-18,9	19,3 ± 3,1 (15-28,3)	12,2 ± 2,71 (10,2-13.2)	17,5-20,5
	L	4,5 ± 0,6 (3,5-5,0)	4-6	5,2 ± 0,9 (3,8-7,4)	4,5 ± 0,91 (3,8-4,8)	3,2-4,4
Abertura oral	C	328 ± 34 (283-354)	-	615 ± 209 (373-1286)	614 ± 13 (580-642)	-
	L	470 ± 67 (425-567)	-	789 ± 255 (289-1286)	723 ± 49 (601-822)	-
Pré faringe	C	342 ± 77 (284-447)	430-510	-	-	192
Faringe	C	695± 68 (528-764)	790-820	855 ± 130 (596-1118)	741± 15 (710-771)	234-323
	L	783 ± 100 (586-878)	1090-1240	935 ± 153 (596-1237)	759± 20 (724-805)	237-326
Bolsa do cirro	C	1170± 80 (1100-1300)	900-940	-	901 ± 6 (886-912)	818-1035
Testículo Anterior	C	675 ± 154 (425-1009)	580-970	1095 ± 366 (328-1857)	831 ± 40 (745-935)	1078-2082
	L	770 ± 154 (531-1027)	580-970	1098 ± 395 (373-1857)	889 ± 50 (779-1008)	1169-1974
Testículo Posterior	C	653 ± 130 (443-835)	460-640	940 ± 357 (373-1771)	803 ± 41 (685-873)	962-1668
	L	755 ± 140 (514-992)	780-1160	940± 263 (447-1571)	837 ± 79 (670-986)	1165-1983
Ovário	C	379 ± 54 (286-457)	300- 490	557 ± 76 (429-771)	416 ± 10 (402-445)	374-465
	L	400 ± 60 (286-514)	310-450	527 ± 87 (328-771)	485± 36 (430-589)	408-532
Ovos (N=50) µm	C	109 ± 3,9 (104-114)	75-102	111 ± 5 (104-116)	116± 0,6 (112-118)	130-146
	L	64 ± 2,5 (60-67)	47-75	60 ± 4 (52-64)	57± 0,6 (54-60)	77-88

Biologia molecular

Para o isolado de *C. mutabile* da LCADM-MG, foram utilizados dois marcadores, sendo o ribossomal 28S e o mitocondrial Nad-1. Com o marcador 28S (1097 pb, 20 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: GTR +G) foi possível a comparação com outras cinco espécies da mesma família, dentre elas, o isolado de *T. cucumerinum* obtido de pato no presente estudo. Na comparação pareada, houve uma divergência de 7,44% com relação a um isolado de *C. mutabile* proveniente da Escócia (AY222249, Olson *et al.*, 2003; dados morfológicos não apresentados). A divergência molecular com relação a outros três gêneros da mesma família foram 4,54% [*T. cucumerinum* (presente estudo)], 4,56% [*Typhlocoelum* sp. (KT956960)], 4,45% [*Tracheophilus cymbius* (MK327367)] e 7,71% [*Neohaematotrephus arayae* (MH725787 e MH725787)]. Na análise filogenética com este marcador, o isolado de *C. mutabile* aqui estudado agrupou-se em um clado bem suportado (1 IB /100 MV) com outros membros da família Cyclocoelidae com sequências disponíveis para análise. Este isolado apresentou-se como uma linhagem divergente das demais espécies, inclusive em relação a um haplótipo escocês identificado como sendo da mesma espécie (GenBank AY222249). Contudo, este último agrupou-se em um clado bem suportado com *Neohaematotrephus arayae*, proveniente do México (FIGURA 19. Nesse sentido, é possível o isolado Europeu pertença a outro gênero, o que demanda uma futura reanálise do material. Em relação a outros membros da superfamília Echinostomatoidea, as divergências moleculares ficaram entre 7,8% e 10,2%.

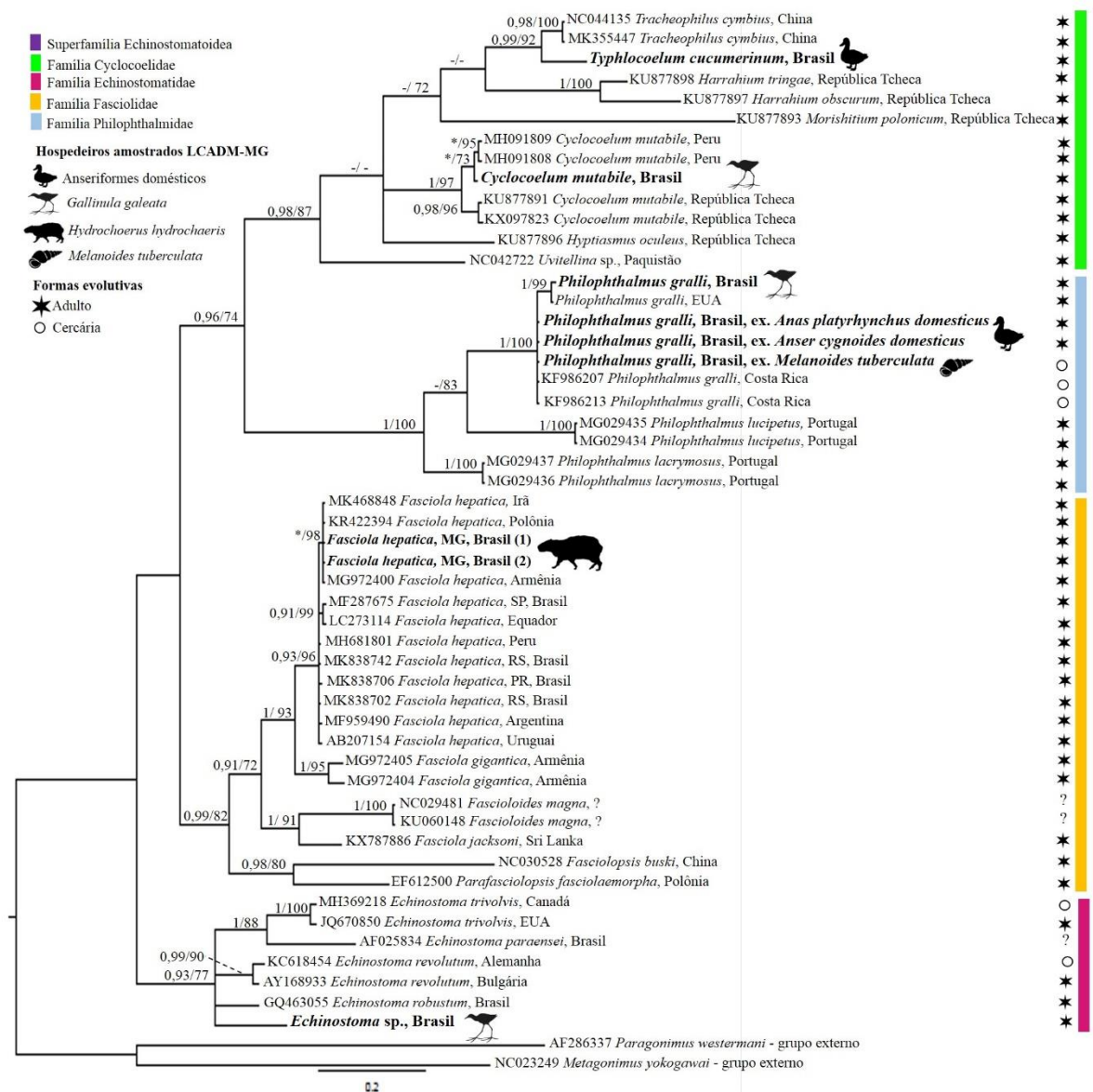
Já na análise utilizando o marcador Nad-1 (364 pb, 53 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: HKY+G), pôde-se observar uma elevada similaridade entre o isolado brasileiro de *C. mutabile* e outros da mesma espécie provenientes do Peru (99,7%) e República Tcheca (96,6%). Considerando-se seis outros gêneros de ciclocelídeos utilizados na análise, as divergências variaram entre 8,45 e 22,25%. Em relação à análise filogenética todos os membros da família Cyclocoelidae agruparam-se no mesmo clado. Além disso, todos os isolados de *C. mutabile* agruparam-se em um clado bem suportado (1 IB/ 97ML), com a formação de subclados separando os haplótipos sul-americanos e europeu. (FIGURA 20).

Figura 19. Árvore filogenética gerada com utilização de sequências dos alinhamentos de DNA ribossomal 28S de trematódeos da superfamília Echinostomatoidea



Legenda: Filograma gerado a partir da análise de Inferência Bayesiana. Os suportes nodais para Inferência Bayesiana foram considerados aqueles iguais ou acima de 90 e, para Máxima Verossimilhança, considerados valores de suporte igual ou acima de 70. Asteriscos referem-se a nodos inexistentes na árvore filogenética com utilização do método de Máxima Verossimilhança. Em negrito encontram-se as sequências do presente estudo.

Figura 20. Árvore filogenética gerada com utilização de sequências dos alinhamentos de DNA mitocondrial Nad-1 de trematódeos da superfamília Echinostomatoidea



Legenda: Os suportes nodais para Inferência Bayesiana foram considerados aqueles iguais ou acima de 90 e, para Máxima Verossimilhança, considerados valores de suporte igual ou acima de 70. Asteriscos referem-se a nodos inexistentes na árvore filogenética com utilização do método de Máxima Verossimilhança. Em negrito encontram-se as sequências do presente estudo.

5.7.2.2 *Typhlocoelum cucumerinum* (Rudolphi, 1809) (Cyclocoelidae: Typhlocoelinae)

Resenha taxonômica

Forma evolutiva: adulto, rédias e metacercárias.

Hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Prevalência hospedeiro intermediário: 1,2% (3/248- consideradas coletas subsequentes e pontos de coleta A e B).

Hospedeiros definitivos:

- 1) *Anas platyrhynchos domesticus*

Prevalência: 25% (2/8) (exame parasitológico de fezes- HPJ).

Número de trematódeos recuperados: 0.

- 2) *Cairina moschata domestica*

Prevalência: 25,53% (12/47) (exame parasitológico de fezes- HPJ e endoscopia).

Número de trematódeos recuperados: 1 espécime.

Sítio de infecção: Traqueia.

Morfologia

Rédias maduras (N=3) (FIGURA 21 A e B): nos moluscos foram encontradas em número de 1 a 3. Corpo de formato cilíndrico, globoso, apêndice locomotor presente na porção posterior. Boca na porção anterior, seguida de faringe. Ceco longo de fundo cego, preenchido por material de coloração escura. Lateral ao ceco observa-se cercárias em distintas fases de desenvolvimento, sendo as mais desenvolvidas concentradas na região mediana a anterior e as menos desenvolvidas na região posterior, onde localiza-se células germinativas. Medem em média 1102,6µm de comprimento ($\pm 417\mu\text{m}$) e 424,1µm de largura ($\pm 110,56\mu\text{m}$).

Cercárias (N=10) (FIGURA 21 C e D): cercárias intramolusco, não emergentes, observadas no interior de rédias e algumas no exterior após dessecação do molusco. Corpo desenvolvido, formato oval, achatado dorsoventralmente, sem cauda. Presença de órgão anterior subterminal, faringe arredondada imediatamente abaixo do órgão anterior. Ceco com duas ramificações, unindo-se em fundo cego na porção posterior do corpo, sem atingir a extremidade. Vesícula excretora desenvolvida, localizada na extremidade posterior do corpo. Medem em média $241,1 \pm 17,27$ (214-259) de comprimento) e $104,3 \pm 5,14 \mu\text{m}$ (98-112) de largura

Metacercárias (N=10) (FIGURA 21 E): formas encistadas encontradas intramolusco apresentando formato arredondado ($156,9 \pm 17,4$ (145,9-176) µm de diâmetro), coloração

amarelo-clara, com parede cística espessa.

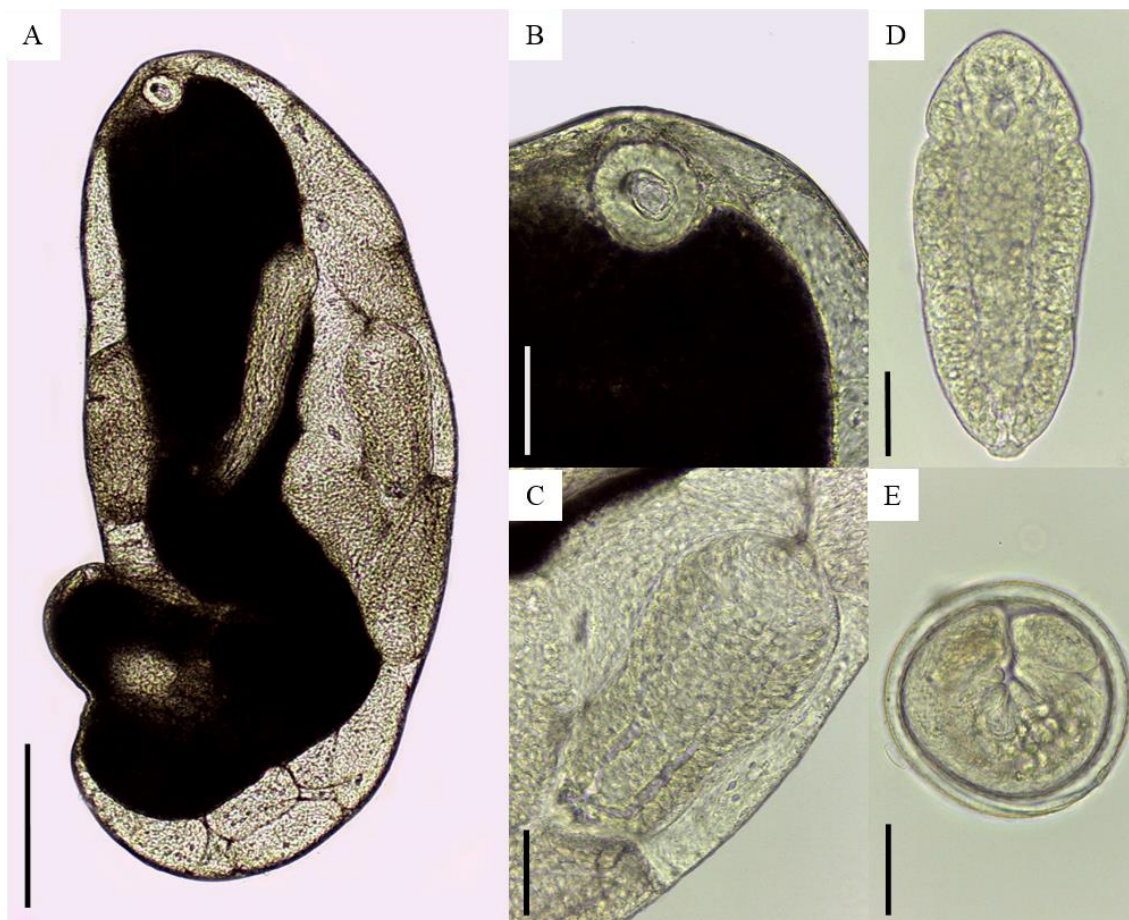
Adulto (N=1): corpo desenvolvido, medindo 15mm de comprimento e 7mm de largura, forma elíptica, cutícula revestida com pequenas escamas (FIGURA 22 A). Ventosa oral subterminal, faringe arredondada, musculosa, medindo 461 μ m de comprimento e 503 μ m de largura (FIGURA 22 B). Cecos medianamente sinuosos, presença de divertículos, estendendo-se até a extremidade posterior, onde se fundem. Ventosa ventral ausente. Poro genital próximo à faringe. Bolsa do cirro de difícil diferenciação neste espécime, assim como a vesícula seminal. Testículos extremamente lobulados, em tandem, testículo anterior localizado no início da extremidade posterior do lado esquerdo até próximo ao arco cecal do mesmo lado, medindo 2,13mm de comprimento e 1,53mm de largura. Testículo posterior localizado no quarto posterior, na região do arco cecal, medindo 1,27mm de comprimento e 2,60mm de largura. Ovário arredondado, medindo 510 μ m de comprimento e 496 μ m de largura, localizado no quarto posterior do lado direito. Abaixo do ovário encontra-se o oótipo, de onde partem os vitelodutos (FIGURA 22 C). Vitelárias foliculares, prolongando-se desde à altura da bifurcação intestinal, até a extremidade posterior, onde os dois ramos opostos se encontram próximos à vesícula excretora.

Ovos: formato elíptico, de coloração amarelo-ouro, com opérculo, medindo (em lâmina montada) 157 μ m \pm 7,7 (131-170 μ m) de comprimento, por 87 μ m \pm 4,3 (77-93 μ m) de largura, contendo em seu interior um miracídio já desenvolvido. Este apresenta manchas ocelares e uma rédia já formada (FIGURA 22 D). Em contato com água, os miracídios eclodem rapidamente ao realizarem movimentos contínuos até a abertura do opérculo, por onde saem nadando ativamente no meio.

Observações: os ovos obtidos pelo exame parasitológico de fezes dos anseriformes criados na LCADM-MG são semelhantes tanto na morfologia, quanto na morfometria àqueles obtidos de um espécime adulto de *T. cucumerinum* recuperado de um anseriforme proveniente do mesmo local. Como nota, trematódeos do gênero *Typhlocoelum* Stossich, 1902, assim como demais ciclocelídeos, apresentam em seu ciclo biológico dois hospedeiros, sendo um molusco (reprodução assexuada), com formação de cercarias e metacercárias não emergentes e o hospedeiro definitivo (traqueia de aves aquáticas), onde ocorre a reprodução sexuada. A infecção do hospedeiro definitivo se dá pela ingestão do molusco infectado (TRAVASSOS, 1950; SCHAFRANKI, 1974; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). No presente estudo foi possível a identificação do molusco transmissor *B. straminea*, assim como os hospedeiros definitivos (anseriformes domésticos). Como caracteres morfológicos de diagnose, parasitos da espécie *T.*

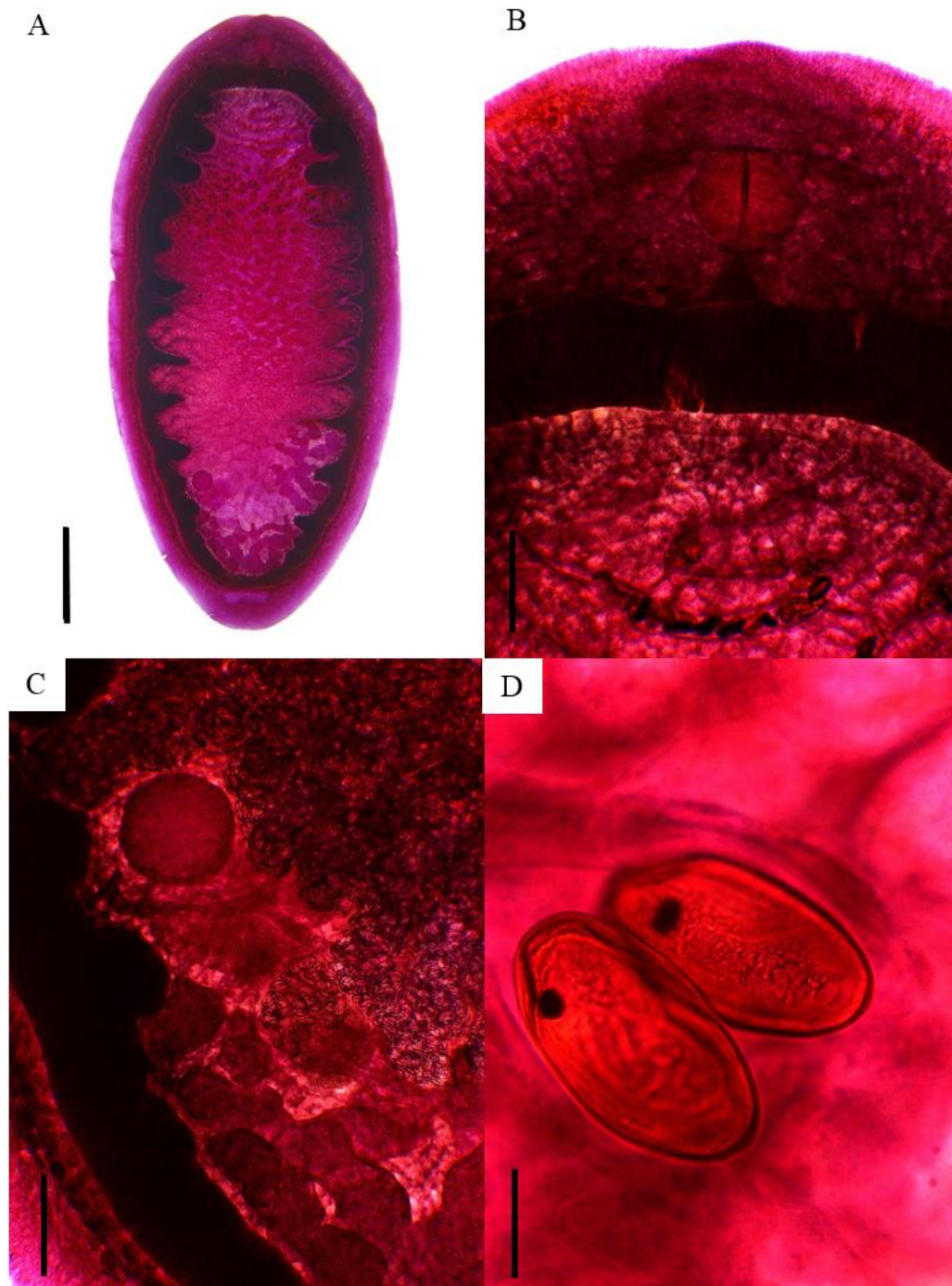
cucumerinum apresentam forma linguiforme, ventosa oral e ventosa ventral ausentes, faringe muscular, testículos fortemente lobados em tandem, poro genital na região pré ou faringeal, cecos com divertículos ao longo da parede interna (DUBOIS, 1959; SCHAFRANKI, 1974; HOYOS *et al.*, 2017), estando condizente com a identificação apresentada no presente estudo.

Figura 21. Formas larvais de *Typhlocoelum cucumerinum* recuperadas de *Biomphalaria straminea* infectados naturalmente, proveniente da LCADM-MG



Legenda: A) Rédia com cercárias no interior. B) Detalhe da faringe e boca com formato arredondado. C) Detalhe de cercária no interior da rédia. D) Cercária externa à rédia. Notar na porção anterior o “órgão da cabeça” e logo abaixo a faringe e cecos, com visualização de proeminência na extremidade posterior correspondente à vesícula excretora. D) Metacercária encistada. Escalas: A- 200 μ m, B-E-50 μ m.

Figura 22. *Typhlocoelum cucumerinum* recuperado de um espécime de *Cairina moschata domestica* infectado naturalmente, proveniente da LCADM-MG



Legenda: A) Espécime adulto. B) Extremidade anterior evidenciando faringe e bifurcação do esôfago. C) Ovário. D) Ovos larvados presente em alça uterina. Escalas: A- 2mm, B-C- 500 μ m, D- 50 μ m.

Biologia molecular

A análise de sequências 28S (1170 pb, 20 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: GTR +G com 46 parâmetros), o haplótipo do presente estudo apresentou maiores valores de similaridade com *Typhlocoelum* sp. (KT956960) (99,3%) e *Tracheophilus cymbius* (MK355447) (99,1%), sendo que na análise filogenética a sequência do presente estudo agrupou-se com outros membros da família Cyclocoelidae, sendo observado o particionamento com uma sequência do mesmo gênero e outro haplótipo identificado como sendo da espécie *T. cymbius*, com formação de um clado bem suportado (1/100) entre esses três haplótipos. Além disso, *T. cucumerinum* se apresenta como uma linhagem divergente e os outros dois isolados se agrupam em mesmo clado. Maiores diferenças moleculares foram verificadas em relação a outros gêneros da família Cyclocoelidae (92,3-92,5%).

Em relação ao marcador Nad-1 (398 pb, 53 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: HKY +G com 108 parâmetros), sequências obtidas a partir de de ovos do espécime adulto, apresentou maior similaridade com *T. cymbius* (MK355447) (91,55%). Considerando-se outros gêneros da família, o percentual de similaridade foi muito menor (84,78% em relação a *Harrahium tringae* (KU877898); ~82% em relação a isolados de *C. mutabile*). Na análise filogenética, *T. cucumerinum* agrupou-se em um clado bem suportado com o isolado chinês de *T. cymbium* (0,99 IB/ 92 MV). Adicionalmente, sequências foram obtidas o marcador mitocondrial COI, o que possibilitou associar a forma adulta encontrada em *C. m. domestica* e estágios larvais encontrados em *B. straminea* (100 % de similaridade). Tendo em vista a escassez/ausência de sequências desta região do *cox-1* para comparação, a análise filogenética não foi realizada. A única espécie da família Cyclocoelidae disponível para comparação e que obteve maior similaridade foi *T. cymbium* (92,8% de similaridade).

5.7.2.3 *Echinostoma* sp. (Echinostomatidae: Echinostomatinae)

Resenha taxonômica

Hospedeiro intermediário: não identificado.

Hospedeiro definitivo: *Gallinula galeata*.

Número de trematódeos recuperados: 19 (7 formas adultas e 12 formas imaturas).

Sítio de infecção: Intestino grosso.

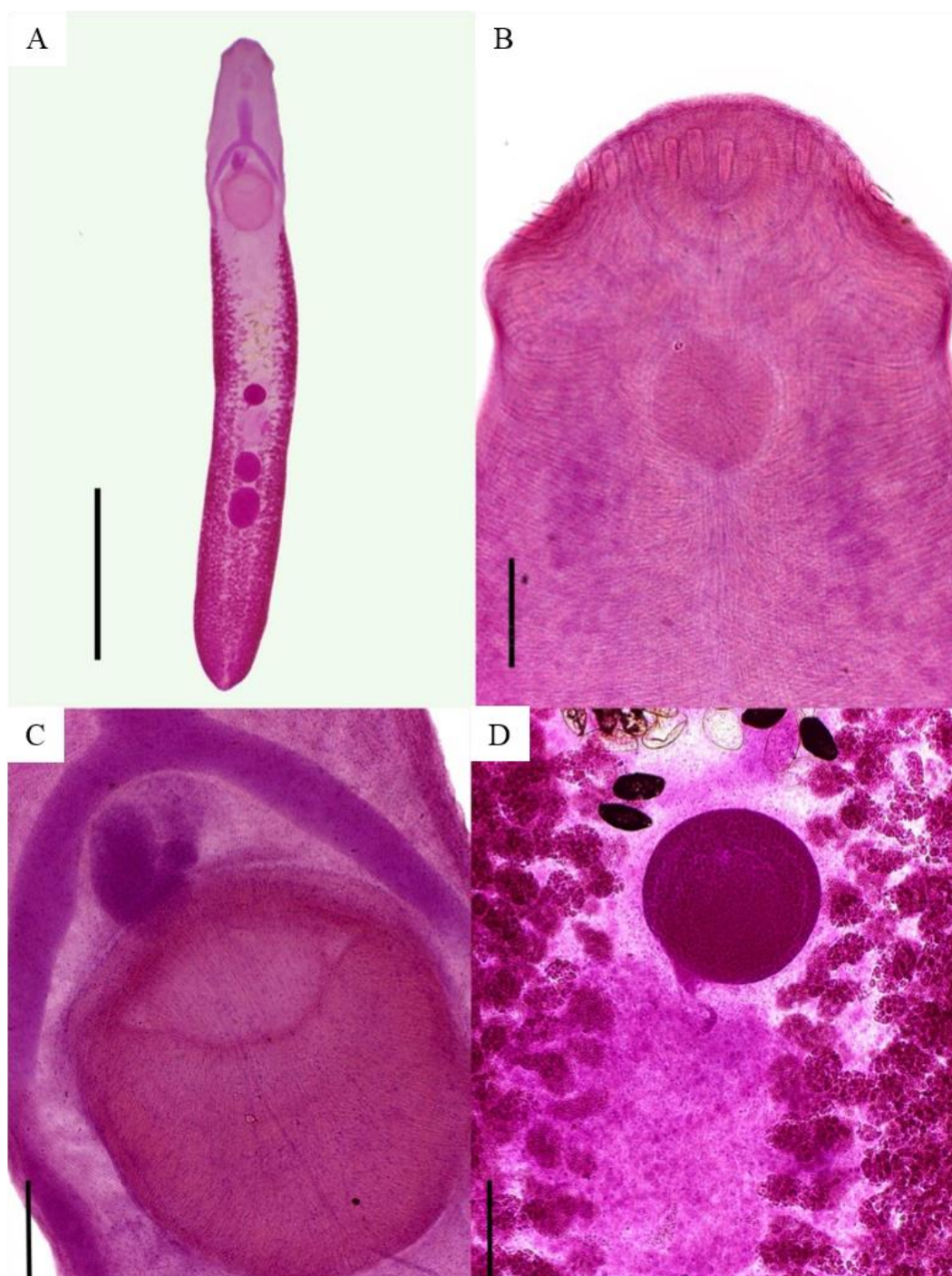
Morfologia

Adultos (n=4): corpo alongado, tegumento apresentando espinhos no seguimento da região posterior sem prolongar-se até a extremidade final (FIGURA 23 A). Colar peristômico presente, contínuo dorsalmente, com espinhos (FIGURA 23 B). Ventosa oral subterminal, pré-faringe de comprimento mediano, faringe pequena e esôfago longo (FIGURA 23 C). Ventosa ventral desenvolvida, localizada no terço anterior do corpo, abaixo da bifurcação intestinal. Cecos lisos, sem divertículos, estendendo-se até a porção final do terço posterior sem unirem-se. Testículo anterior de forma esférica e anterior em sua maioria de forma ovalada, posicionados em tandem, localizados na zona pós-equatorial. Os ductos eferentes observados com clareza em apenas um exemplar, sendo longos e afilados, estendendo-se separadamente desde os testículos e aproximando-se entre si na zona mediana da ventosa ventral, unindo-se em ducto deferente na delimitação entre a ventosa ventral e a bolsa do cirro. Bolsa do cirro pequena, encurvada em forma de C, localizada entre a borda superior da ventosa ventral e posterior à bifurcação intestinal. Vitelária folicular, irregular, intercecal, cecal e extracecal, prolongando-se desde o terço médio do corpo, na zona acetabular até o terço final, neste último, com completo preenchimento do corpo, com encontro dos folículos próximos à extremidade posterior. Glândula de Mehlis e demais anexos reprodutivos localizados entre o testículo anterior e o ovário (FIGURA 23 D). Ovário esférico, liso, com posição equatorial. Útero em posição intercecal, com curvaturas sinuosas, contendo poucos ovos em seu interior, com alça prolongando-se lateralmente à ventosa ventral, a desembocar no poro genital localizado entre a ventosa ventral e pós-bifurcação intestinal. Ovos de formato ovalado, com base mais arredondada e opérculo na porção mais afilada, de coloração amarelada, não embrionado. Os dados morfométricos são apresentados na TABELA 13.

Observações: Os dados morfológicos aqui apresentados são condizentes com os caracteres de diagnose para o gênero *Echinostoma* Rudolphi, 1809, conforme descrito por

diferentes autores, como: colar cefálico muscular, com coroa de espinhos ininterruptos ventralmente, bolsa do cirro pequena, localizada posterior à bifurcação intestinal e anterior à ventosa ventral, contendo pars prostática, vesícula seminal e cirro liso; poro genital anterior à ventosa ventral, ovário equatorial (KANEV, 1994; KOSTADINOVA, 2005; KANEV *et al.*, 2009). Como nota, trematódeos deste gênero possuem três hospedeiros, sendo um hospedeiro intermediário invertebrado (molusco), onde ocorre a reprodução sexuada; um segundo hospedeiro intermediário, podendo ser invertebrado ou vertebrado (ex.: moluscos, peixes, répteis, anfíbios e planárias), com formação de metacercárias e o hospedeiro definitivo vertebrado (aves e mamíferos), onde se realiza a reprodução sexuada do parasito (TRAVASSOS, 1950; KANEV, 1994; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). No presente estudo, não foram encontrados os hospedeiros intermediários deste trematódeo.

Figura 23. *Echinostoma* sp., recuperado de um espécime *Gallinula galeata* infectado naturalmente, proveniente da LCADM-MG



Legenda: A) Espécime adulto. B) Extremidade anterior evidenciando o colar de espinhos, ventosa oral e faringe. C) Porção anterior evidenciando ventosa ventral desenvolvida, com saco do cirro logo acima, pós-bifurcal e ductos eferentes estendendo-se cruzando a ventosa ventral e aproximando-se próximos à bolsa do cirro. D) Porção mediana do corpo com observação do ovário arredondado entre vitelária folicular e complexo da glândula de Mehlis posteriormente. Escalas: A-2mm. B, C e D- 200μm.

Tabela 13. Dados morfométricos de espécimes do gênero *Echinostoma* já descritos no Brasil.

Espécie	<i>Echinostoma</i> sp.	<i>E. rodriguesi</i>	<i>E. erraticum</i>	<i>E. microrchis</i>	<i>E. neglectum</i>	<i>E. revolutum</i>
Hospedeiro	<i>Galinula galeata</i>	Aves e roedores	Aves e roedores	<i>Laterallus viridis</i>	<i>Nyctanassa violacea</i>	<i>G. g. domesticus</i>
Localidade	BH, MG, Brasil	BH, MG, Brasil	Goiânia, GO,	RJ, RJ, Brasil	RJ, RJ, Brasil	Alemanha
Referência	Presente estudo	Hsu <i>et al.</i> , 1968	Komma, 1972	Kohn & Fernandes,	Kohn & Fernandes,	Kanev, 1994
Parâmetros/Espécime	4	20	23	1	5	-
Nº Espinhos colar	-	37	37 (35-39)	37	37-45	37
Corpo mm	C 8,55 ± 1,1 (7,2-	3,87-6,80	7,14 (5,47-9,02)	5,34	5,57 (4,40-6,43)	6,4-30
	L 1,75 ± 0,29 (1,2-	0,54-1,29	1,70 (1,07-2,41)	1,19	0,95 (0,75-1,09)	0,62-1,63
Ventosa oral	C 284 ± 31 (248-	144-276	200 (138-258)	170	124 (110-140)	180-296
	L 340 ± 20 (312-355)	132-240	220 (102-301)	160	140 (130-150)	170-280
Pré faringe	C 191 ± 43 (156-241)	96	86-172	-	-	250
Faringe	C 241 ± 14 (220-248)	105-252	200 (88-258)	150	134 (110-150)	130-240
	L 223 ± 12 (212-234)	102-204	180 (83-236)	160	112 (80-140)	100-180
Esôfago	C 601 ± 81 (532-709)	240-480	172-314	250	202 (180-230)	-
Ventosa ventral	C 936 ± 48 (879-993)	408-840	590 (538-682)	590	616 (500-720)	460-620*
	L 803 ± 49 (759-858)	432-720	620 (538-688)	610	580 (530-610)	460-620*
Bolsa do cirro	C 293 ± 50 (248-347)	-	-	-	358 (270-510)	-
	L 123 ± 18 (106-142)	-	-	-	152 (100-230)	-
Testículo anterior	C 454 ± 26 (425-475)	204-444	430 (330-550)	230	632 (380-760)	260-480
	L 466 ± 36 (425-496)	180-384	477 (320-520)	250	316 (230-360)	150-540
Testículo posterior	C 599 ± 71 (496-652)	249-588	570 (420-699)	280	662 (440-740)	314-614
	L 526 ± 48 (475-588)	168-384	560 (220-700)	220	316 (220-380)	172-515
Ovário	C 346 ± 35 (319-397)	168-300	300 (250-380)	280	290 (160-400)	130-460*
	L 356 ± 21 (333-383)	144-360	330 (310-440)	360	216 (190-250)	130-460*
Ovos (N=50) µm	C 105 ± 2 (104-107)	-	100 (96-112)	84-93	75-105	-
	L 53 ± 2 (50-55)	-	59 (57-64)	47-56	38-64	-

Legenda. (C) comprimento. (L) largura. (N) número. (E) Experimental. *medidas de circunferência

Biologia molecular

Foram utilizados para a caracterização molecular deste trematódeo, dois marcadores, sendo o ribossomal 28S (1128 pb, 20 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: GTR +G com 46 parâmetros) e o mitocondrial Nad-1 (485 pb, 53 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: HKY+G com 108 parâmetros). A análise de sequências do gene 28S confirmou a identificação da espécie como um membro do gênero *Echinostoma*, sendo verificado baixa diferença interespecíficas (0,3-0,9%) em relação a outras espécies do gênero advindas de distintos continentes (similaridades de 99,7% *E. caproni* MK482501- Quênia; 99,6% *E. miyagawai* KY436408- Nova Zelândia; 99,6% *E. paraulum* KP065604- Alemanha; 99,3% *E. paraensei* EU025867- EUA; 99,2% *E. bolschewense* KP065591- Eslováquia e 99,1% *E. revolutum* AY222246- Reino Unido). Já em relação a outros membros da superfamília Echinostomatoidea, o percentual de diferença foi bem variável, estando os valores acima dos alcançados para as divergências interespecíficas, com resultados entre 2,89% (*Echinoparymphiium ellisi*: Echinostomatidae- KY436410); 7,08% (*Fasciola hepatica*: Fasciolidae- MF099788); 8,29% (*Philophthalmus gralli*: Philophthalmidae- JQ678322) e 13,3% (*Neohaematotrepheus arayae*- Cyclocoelidae MH725787). Na análise filogenética, *Echinostoma* sp. agrupou-se em um clado bem suportado (1 IB/ 94 MV) com outros membros do gênero *Echinostoma* pertencentes ao complexo *Echinostoma revolutum*. Contudo, verificou-se uma politomia entre os membros deste clado. Em relação ao marcador mitocondrial Nad-1, as divergências entre *Echinostoma* sp. e outras espécies do gênero (*E. revolutum*, *E. trivolvis*, *E. cinetorchis*, *E. miyagawai* e *E. robustum*), variaram entre 12 e 15,3%, revelando assim tratar-se de uma espécie distante das que possuem sequências disponíveis para comparação. Na análise filogenética, as espécies deste gênero também se agruparam em um mesmo clado (0,93 IB/ 77 ML) (FIGURA 20).

5.7.2.4 *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Fasciolidae: Fasciolinae)

Resenha taxonômica

Hospedeiro intermediário: não identificado.

Hospedeiro definitivo: *H. hydrochaeris*.

Prevalência: 100% (2/2).

- 1) Capivara 1: macho jovem-adulto (aproximadamente 35kg).

Número de trematódeos recuperados: 89 espécimes.

Sítio de infecção: Fígado (ductos e parênquima) e vesícula biliar.

- 2) Capivara 2: fêmea jovem (aproximadamente 15kg).

Número de trematódeos recuperados: 71 espécimes.

Sítio de infecção: Fígado (ductos e parênquima) e vesícula biliar.

Morfologia

Adultos (N=30): *in vivo* são alongados, de coloração rósea-acastanhada, com formato foliáceo, pouco ativos. Foram encontradas formas jovens e adultas que variaram em comprimento entre 2 a 30 mm (FIGURA 24). Corados e montados em lâminas permanentes: corpo achatado dorso-ventralmente, tegumento coberto por pequenos espinhos. Cone cefálico na extremidade anterior, ventosa oral pequena e subterminal. Faringe pequena e arredondada. Esôfago longo com bifurcação intestinal na linha mediana do cone cefálico, de onde partem os cecos com ramificações longas voltadas externamente e ramificações menores voltadas internamente. Ventosa ventral localizada na base do cone cefálico, arredondada ou ligeiramente achatada transversalmente, maior que a oral. Dois testículos em tandem, dendríticos, localizados no terço médio do corpo. Saco do cirro pequeno, pós-bifurcal e anterior à ventosa ventral. Ovário dendrítico, localizado no terço anterior, à esquerda do corpo, acima dos ramos do testículo anterior. Glândula de Mehlis arredondada e ovalada longitudinalmente, na linha mediana longitudinal. Útero curto, anterior à glândula de Mehlis, com muitas curvaturas. Vitelária abundante, com folículos muito pequenos preenchendo praticamente todo o terço final do corpo, estendendo-se pelas laterais, alcançando dorsalmente os ramos cecais na porção anterior. Ovos elípticos, de coloração dourada, operculados, não embrionados.

Observações: Os dados morfológicos apresentados são condizentes com os descritos por diferentes autores para a espécie *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (FREITAS, 1981; SOULSBY, 1982; JONES *et al.*, 2005).

Figura 24. Espécimes de *Fasciola hepatica* recuperados dos ductos hepáticos de *Hydrochoerus hydrochaeris*, provenientes da LCADM-MG



Legenda: Da esquerda para a direita, os três exemplares menores são formas imaturas e os dois maiores são formas adultas (observar útero repleto de ovos). Escala: 2mm.

Biologia molecular

Como breve contextualização, os estudos moleculares envolvendo *F. hepatica* iniciou-se antes do encontro dos parasitos adultos nas capivaras. Amostras de material fecal destes roedores foram processadas segundo a técnica de quatro tamises (GIRÃO e UENO, 1985) e os ovos encontrados incubados em água desclorada por aproximadamente 10 dias em temperatura ambiente. Amostras dos miracídios obtidos foram coletadas e fixadas para procedimentos de biologia molecular sendo inicialmente realizada a obtenção de sequências 28S (1093 pb, 20 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: GTR +G com 46 parâmetros). A análise deste marcador revelou 100% de similaridade com isolados de *F. hepatica* oriundos de diferentes hospedeiros provenientes da Oceania e África. Na comparação interespecífica com membros da mesma família, as divergências ficaram entre 0,11-0,33% em relação a *F. gigantica* (HM004190- Tailândia, EU025873- Quênia); 2% *F. jacksoni* (MF099789- Sri Lanka); 2,11% *Fascioloides magna* (KU232370- EUA) e 3,79% *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (EU025869- Polônia). Considerando-se espécies de outras famílias de Echinostomatoidea avaliadas no presente estudo (Cyclocoelidae, Echinostomatidae, Philophthalmidae), as diferenças foram maiores (7,58 a 12,7%. Na análise filogenética foi possível observar a formação de um clado referente à família Fasciolidae, com significativo valor de suporte (FIGURA 19).

Em relação ao marcador Nad-1 (313 e 461 pb, 53 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: HKY+G com 108 parâmetros), na comparação pareada, os dois espécimes isolados de cada uma das capivaras foram idênticos entre si e em relação a isolados provenientes de diferentes localidades (MK468848- Irã; MG972400- Armênia e KR422394- Polônia). Em relação aos isolados sul americanos, os haplótipos do presente estudo divergiram em 0,3% com outros três provenientes da região Sul do país (MK838742, MK838702, MK838706), assim como o mesmo valor para haplótipos oriundos do Peru (MH681801), Argentina (MF959490) e Uruguai (AB207154). Os haplótipos que apresentaram maiores divergências na comparação pareada (0,6%) são provenientes da Região Sudeste do país, do estado de São Paulo, curiosamente tendo o mesmo hospedeiro (capivara) (MF287675) e também do Equador (LC273114). Já na comparação com outras espécies do gênero, as divergências variaram entre 6,13 a 10,3% (*F. gigantica* e *F. jacksoni*, MG972405 e KX787886, respectivamente). Considerando-se outros membros da mesma família essa variação foi maior (12,3 e 18,1% em relação a *F. magna*- KU060148 e *F. buski*- NC030528, respectivamente). Na análise filogenética os dois isolados do presente estudo agruparam-se em um clado bem suportado (0,93 IB/ 96

MV) com isolados de *F. hepatica* da América do Sul, incluindo o Brasil, e da Europa e do Oriente Médio. Com relação a outros membros da família, a topologia da árvore filogenética observou-se o particionamento entre membros de distintos gêneros, exceto por um haplótipo requerido como *Fasciola jacksoni* (KX787886), proveniente da Índia, ao qual, agrupou-se primeiramente em um clado com outro gênero *Fascioloides magna* (KU060148 e NC029481- dados não publicados), formando a partir daí uma ramificação com alto valor de suporte (1 IB/ 91 MV), estando então como uma linhagem independente (FIGURA 20).

5.7.2.5 *Philophthalmus gralli* Mathis & Leger, 1910 (Philophthalmidae: Philophthalminae)

Resenha taxonômica

Hospedeiro intermediário: M. tuberculata.

Tipo cercariano: Megalura.

Prevalência: 1,61% (73/4.545) e 90,12% entre os espécimes infectados (coletas regulares).

Hospedeiros definitivos:

1) *Gallus gallus domesticus* (Experimental).

Prevalência: 100% (4/4) (EOD).

Sítio de infecção: saco conjuntival e membrana nictitante.

Número de trematódeos recuperados: 5 espécimes.

2) *Anser cygnoides domesticus*

Prevalência: 67% (4/6) (EOD).

Sítio de infecção: saco conjuntival e membrana nictitante.

Número de trematódeos recuperados: 32 espécimes.

3) *Anas platyrhynchos domesticus*

Prevalência: 25% (2/8) (EOD).

Sítio de infecção: saco conjuntival e membrana nictitante.

Número de trematódeos recuperados: 0.

4) *Cairina moschata domestica* (infecção natural)

Prevalência: 31% (15/47) (EOD).

Sítio de infecção: saco conjuntival e membrana nictitante.

Número de trematódeos recuperados: 25 espécimes.

5) *Gallinula galeata*

Sítio de infecção: saco conjuntival e membrana nictitante.

Número de trematódeos recuperados: 147 espécimes, sendo 64 recuperados no olho direito e 83 no olho esquerdo.

Sítio de infecção: saco conjuntival e membrana nictitante.

Morfologia

Cercárias: *in vivo* são larvas ativas, emergindo em pequena quantidade na maioria das vezes, observada no período da manhã após fotoestimulação artificial e encistamento rápido na placa de poliestireno ou nas conchas dos moluscos. Corpo cercariano alongado, com presença de espinhos no tegumento. Ventosa oral subteminal, prolongamento da pré-faringe, faringe muscular com bifurcação dos cecos próximos próxima à borda anterior da ventosa ventral. Cecos longos, alcançando a porção terminal. Ventosa ventral presente na região mediana do corpo, cauda simples e extremidade apresentando glândulas adesivas com terminação abrupta.

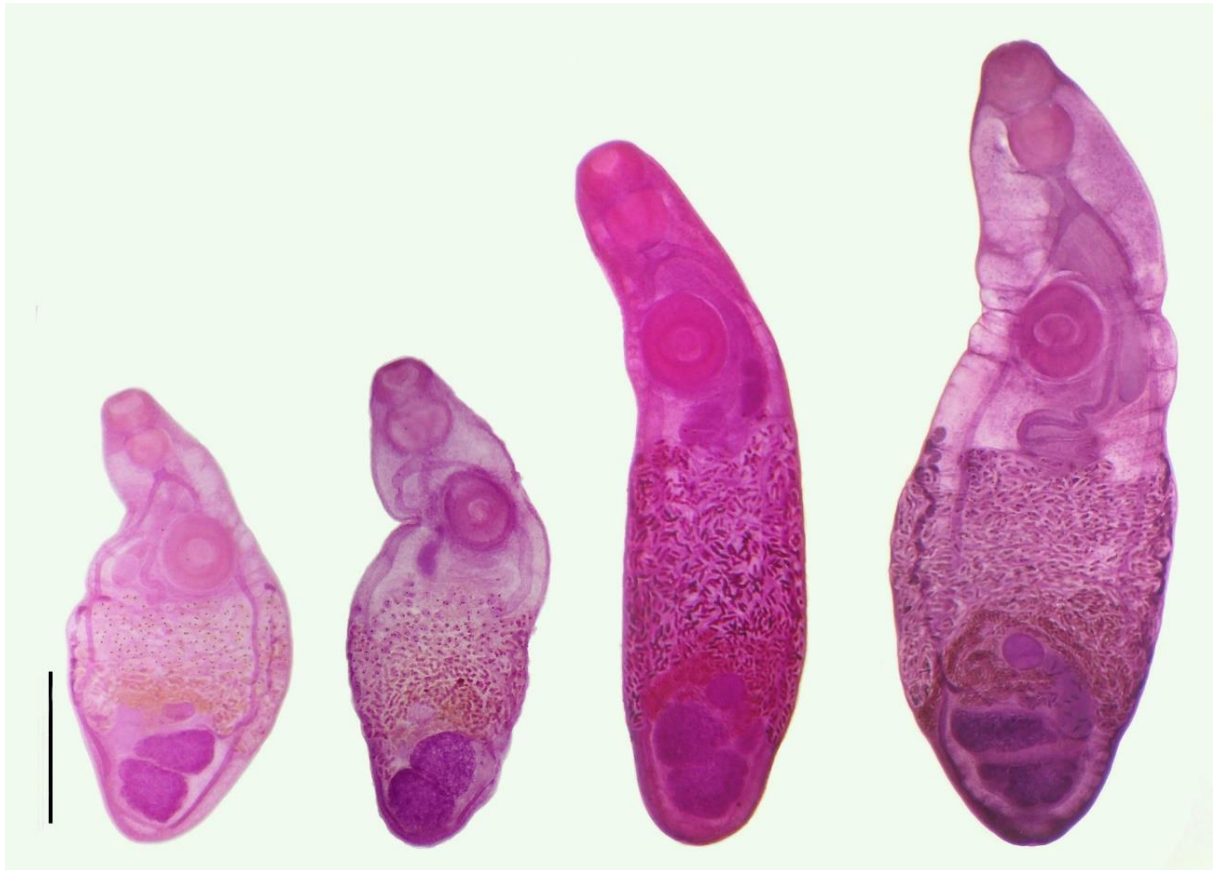
Metacercárias: possuem formato piriforme com cápsula delicada, sendo facilmente desencistadas com água à 40°C ou estiletos.

Adultos (FIGURA 25): *in vivo* apresentam coloração rósea-amarelada, ativos, com forte aderência pela ventosa ventral à mucosa ocular dos animais e, quando retirados, aderindo-se uns aos outros na placa de Petri com solução salina. Ventosa oral presente na extremidade anterior e ventosa ventral situada no terço anterior do corpo mais desenvolvida que a anterior. Esôfago e pré-faringe curtos, faringe desenvolvida e musculosa, onde logo após ocorre a bifurcação do esôfago. Poro genital localizado ventralmente à bifurcação intestinal ou no mesmo nível. Cecos estreitos, atingindo a extremidade posterior do corpo, podendo apresentarem-se levemente sinuosos ou com divertículos laterais rasos. Ovário arredondado, pequeno, localizado medianamente, pré-testicular. Testículos em tandem ou levemente oblíquos, localizados no terço posterior do corpo, lobulados. A vesícula seminal pode ser alongada ou globular e sua posição varia de acordo com a localização e exposição do cirro. Metratermo musculoso e sinuoso localizado ao lado do saco do cirro. Canal de Laurer's com ducto dirigido dorsalmente ao testículo anterior. Útero sinuoso, longitudinalmente preenchendo o espaço entre o testículo anterior e a ventosa ventral, lateralmente atinge as bordas, sendo intracecal, cecal e extracecal, com ovos em vários estádios de desenvolvimento, sendo alguns com miracídios que, conforme se desenvolvem, apresentam mancha ocelar. Ovos viáveis maiores, com formato elíptico, ligeiramente encurvados, extremidades arredondadas, coloração amarela, não operculados, contendo em seu interior um miracídio. Ovos inviáveis menores, sem presença de larvas, ligeiramente encurvados. Vitelária longa, tubular, presente ao longo da margem exterior dos cecos, estendendo-se até a borda posterior da ventosa oral. Os dados morfométricos são apresentados na TABELA 14.

Observações: o estudo morfológico das formas larvais e adultas aqui apresentado é compatível conforme as descrições publicadas por outros autores (CHING, 1961; DIAZ

et al., 2002; PINTO & MELO, 2010).

Figura 25. *Philophthalmus gralli*: Adultos obtidos de anseriformes domésticos e *Gallinula galeata* de vida livre provenientes da LCADM-MG e de *Gallus gallus domesticus* infectado experimentalmente.



Legenda: Da esquerda para a direita: espécime recuperado de *Gallinula galeata*, *Cairina moschata domestica*, *Gallus gallus domesticus* e *Anser cygnoides domesticus*, respectivamente. Escala: 1mm.

Tabela 14. Dados morfométricos de *Philophthalmus gralli* recuperados de diferentes espécies de aves na LCADM-MG. Medidas de exemplares obtidos experimentalmente em *Gallus gallus domesticus* são apresentados para comparação. Dados apresentados em micrometros (exceto quando demonstrado de outra forma)

Hospedeiro		<i>Anser cygnoides domesticus</i>	<i>Cairina moschata domestica</i>	<i>Gallinula galeata</i>	<i>Gallus gallus domesticus</i>
Infecção		Natural	Natural	Natural	Experimental
Parâmetros	N	32	19	20	5
Corpo	C	4721 ± 737 (3167-5880)	3123 ± 587 (2002-3932)	3069 ± 453 (2421-4005)	4052 ± 683 (3276-5042)
	L	1591 ± 323 (837-2203)	925 ± 268 (528-1529)	1370 ± 170 (1019-1748)	1296 ± 165 (1092-1493)
Ventosa oral	C	330 ± 47,5 (248-440)	279 ± 32 (241-355)	255 ± 32 (191-305)	384 ± 58 (319-475)
	L	448 ± 55 (326-546)	360 ± 60 (248-468)	352 ± 45 (291-475)	454 ± 73 (355-560)
Faringe	C	339 ± 42 (255-425)	265 ± 53 (184-355)	251 ± 31 (206-312)	350 ± 14 (333-369)
	L	381 ± 48 (298-468)	311 ± 85 (191-461)	265 ± 31 (213-326)	420 ± 32 (390-468)
Ventosa ventral	C	609 ± 82 (418-709)	463 ± 74 (312-567)	525 ± 46 (461-603)	630 ± 25 (602-659)
	L	554 ± 74 (390-652)	424 ± 50 (355-510)	466 ± 39 (397-560)	587 ± 28 (539-610)
Bolsa cirro	C	1204 ± 256 (695-1737)	838 ± 125 (709-1078)	805 ± 142 (596-1063)	1120 ± 178 (957-1418)
Ovário	C	221 ± 41 (142-284)	136 ± 41 (57-212)	159 ± 27 (120-227)	221 ± 26 (184-248)
	L	255 ± 46 (163-333)	155 ± 51 (64-248)	200 ± 31 (156-255)	268 ± 44 (220-326)
Testículo	C	488 ± 177 (149-744)	263 ± 73 (142-390)	324 ± 69 (163-461)	434 ± 75 (355-510)
	L	716 ± 164 (404-1063)	304 ± 94 (142-496)	464 ± 75 (298-603)	573 ± 110 (425-723)
Testículo	C	587 ± 123 (319-943)	262 ± 90 (142-447)	332 ± 66 (241-496)	455 ± 65 (404- 567)
	L	729 ± 148 (319-1006)	310 ± 109 (156-546)	482 ± 77 (319-681)	583 ± 128 (425-766)
Ovos (N=50)	C	94 ± 8 (80-107)	90 ± 5 (84-102)	88 ± 4 (80-93)	90 ± 7 (73-100)
	L	36 ± 2 (30-41)	37 ± 2 (34-43)	36 ± 3 (32-44)	33 ± 3 (29-38)

Biologia Molecular

Sequências Nad-1 (428 pb -referente aos quatro hospedeiros amostrados-, 53 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: HKY+G com 108 parâmetros), foram obtidas a partir de amostras de *P. gralli* recuperadas de aves naturalmente (*A. c. domesticus*, *C. m. domestica* e *G. galeata*) e experimentalmente (*G. g. domesticus* exposto ao isolado obtido de *M. tuberculata* da mesma localidade) infectadas. Os resultados obtidos revelaram 99,3-100% de similaridade com isolados de *P. gralli* de diferentes localidades. A maioria das amostras (3/4) apresentou 100% de similaridade com outros isolados latino americanos de *P. gralli*, sendo a exceção o isolado obtido em *G. galeata*, que divergiu em 1,5% dos demais isolados do local e teve similaridade mais próxima com um isolado obtido de *Rhea americana* da América do Norte (99,6%). Em relação a comparação interespecífica no mesmo gênero, outras duas espécies com sequências disponíveis, *P. lacrymosus* e *P. lucipetus*, divergiram entre 14,3 e 14,7%, respectivamente. Considerando-se outras famílias de Echinostomatoidea, as diferenças foram consideravelmente elevadas (21,93-28,06%). Em relação à análise filogenética, todas as onze sequências de *Philophthalmus* spp. utilizadas no estudo se agruparam em um clado com alto valor de suporte (1 IB/ 100 MV). Além disso, verificou-se a formação de um clado entre *P. gralli* e *P. lucipetus*, assim como uma posição basal de *P. lacrymosus*. Dentro do clado de *P. gralli*, verificou-se o agrupamento do haplótipo encontrado em *G. galeata* com o isolado norte americano obtido em *Rhea americana* (FIGURA 20).

5.7.2.6 *Taxorchis* sp. (Paramphistomoidea: Cladorchiidae)

Resenha taxonômica

Forma evolutiva: adulto.

Hospedeiro intermediário: não identificado.

Hospedeiro definitivo: *H. hydrochaeris*.

Prevalência: 50% (1/2).

Exemplar 1: macho jovem-adulto (aproximadamente 35kg).

Número de trematódeos recuperados: 7 espécimes.

Sítio de infecção: Intestino grosso (ceco).

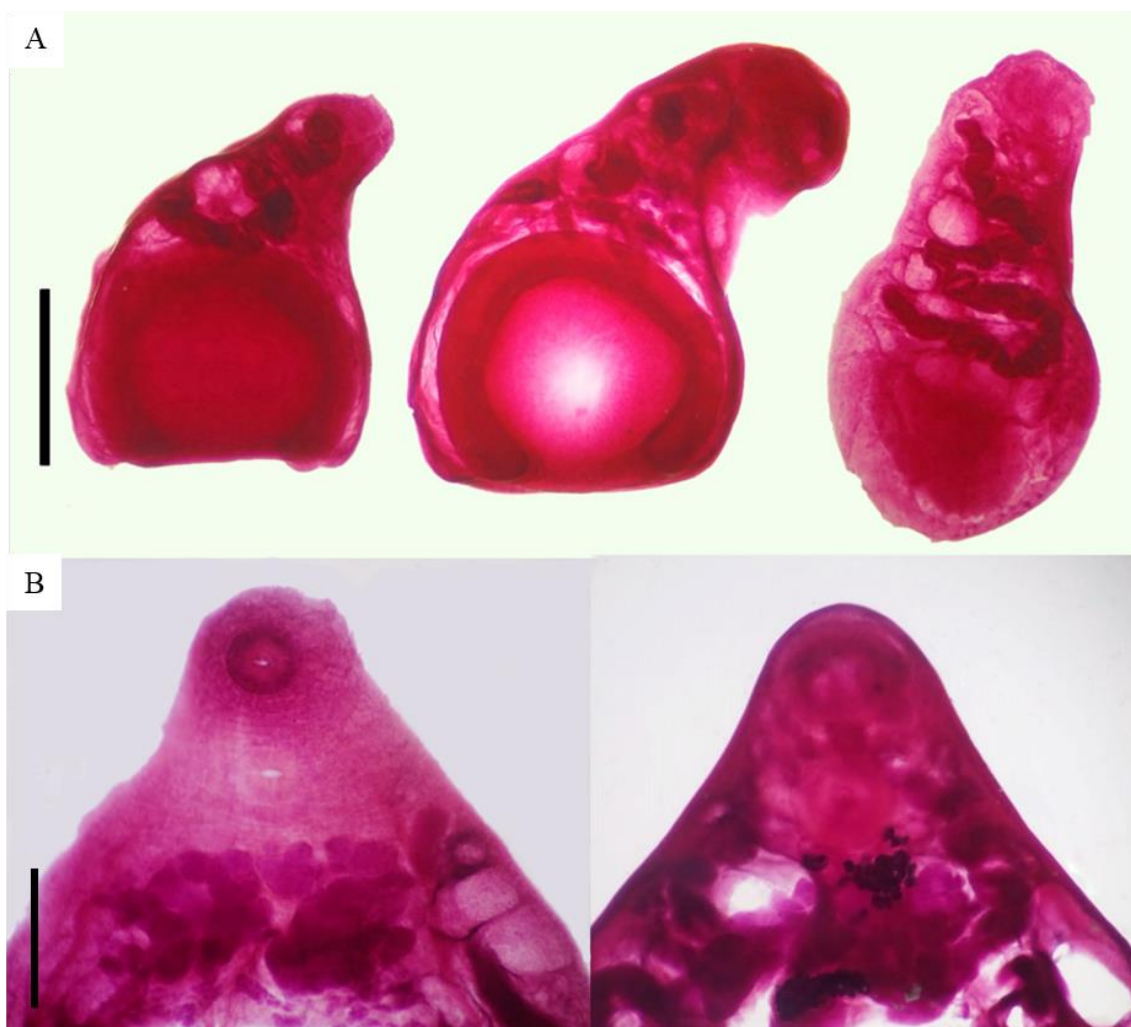
Morfologia

Adulto: corpo cônico, robusto, de coloração rósea-clara. Ventosa oral subterminal, seguida de faringe na porção mais afilada (encurvada para frente). Poro genital localizado abaixo da faringe. Acetáculo ventroterminal, desenvolvido, estando fortemente fixado na mucosa cecal. Os trematódeos foram seccionados (como referência o poro genital) em posição lateral (FIGURA 26 A) e frontal (FIGURA 26 B) para avaliar a morfologia e posição das estruturas internas, sendo: esôfago longo, bifurcação intestinal na porção anterior, onde inicia-se dois ramos do ceco que se prolongam aproximadamente até o início do terço final. Poro genital abaixo da ventosa oral, arredondado, pós-bifurcal. Bolsa do cirro pequena, anterior ao poro genital. Testículos localizados na porção anterior, pós-bifurcal, lateralizados, lobulados. Ovário pequeno não diferenciado. Vitelária diferenciada apenas no espécime mais desenvolvido, sendo confluenta na linha média do corpo acima do acetábulo. Útero com poucas curvaturas, sendo observado no espaço intertesticular apenas no espécime mais desenvolvido (corte frontal) (FIGURA 26 B). Presença de poucos ovos apenas no exemplar mais desenvolvido.

Observações: Como nota, trematódeos do gênero *Taxorchis* Fiscoeder, 1901, ainda não têm seu ciclo biológico completamente elucidado, mas provavelmente, assim como demais paranfistomoides, apresenta dois hospedeiros, sendo o hospedeiro intermediário um molusco (onde ocorre a reprodução assexuada), com formação de cercárias que emergem do invertebrado e encistam na vegetação, formando metacercárias infectantes para o hospedeiro definitivo, sendo estes os mamíferos, onde ocorre a reprodução sexuada (FAUST, 1935; TRAVASSO, 1950; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). No presente estudo, não se obteve a identificação do molusco transmissor deste trematódeo.

O estudo morfológico envolvendo os espécimes apresentados no presente estudo possibilitou a identificação até a categoria de gênero, pois apenas um trematódeo apresentou-se com maturidade sexual. Neste, foram observados caracteres de diagnose condizentes com aquelas publicadas por diferentes autores, como: formato robusto do corpo, acetábulo terminal, cecos paralelos, lisos, alcançando a borda anterior do acetábulo, poro genital na região da bifurcação intestinal, testículos localizados no terço médio do corpo, simétricos e lobulados; vitelária anterior aos testículos (FAUST, 1935; TRAVASSOS, FREITAS & KOHN, 1969; JONES, 2005).

Figura 26. Espécimes de *Taxorchis* sp. recuperados de *Hydrochoerus hydrochaeris* provenientes da LCADM-MG



Escala: A, B- 1mm.

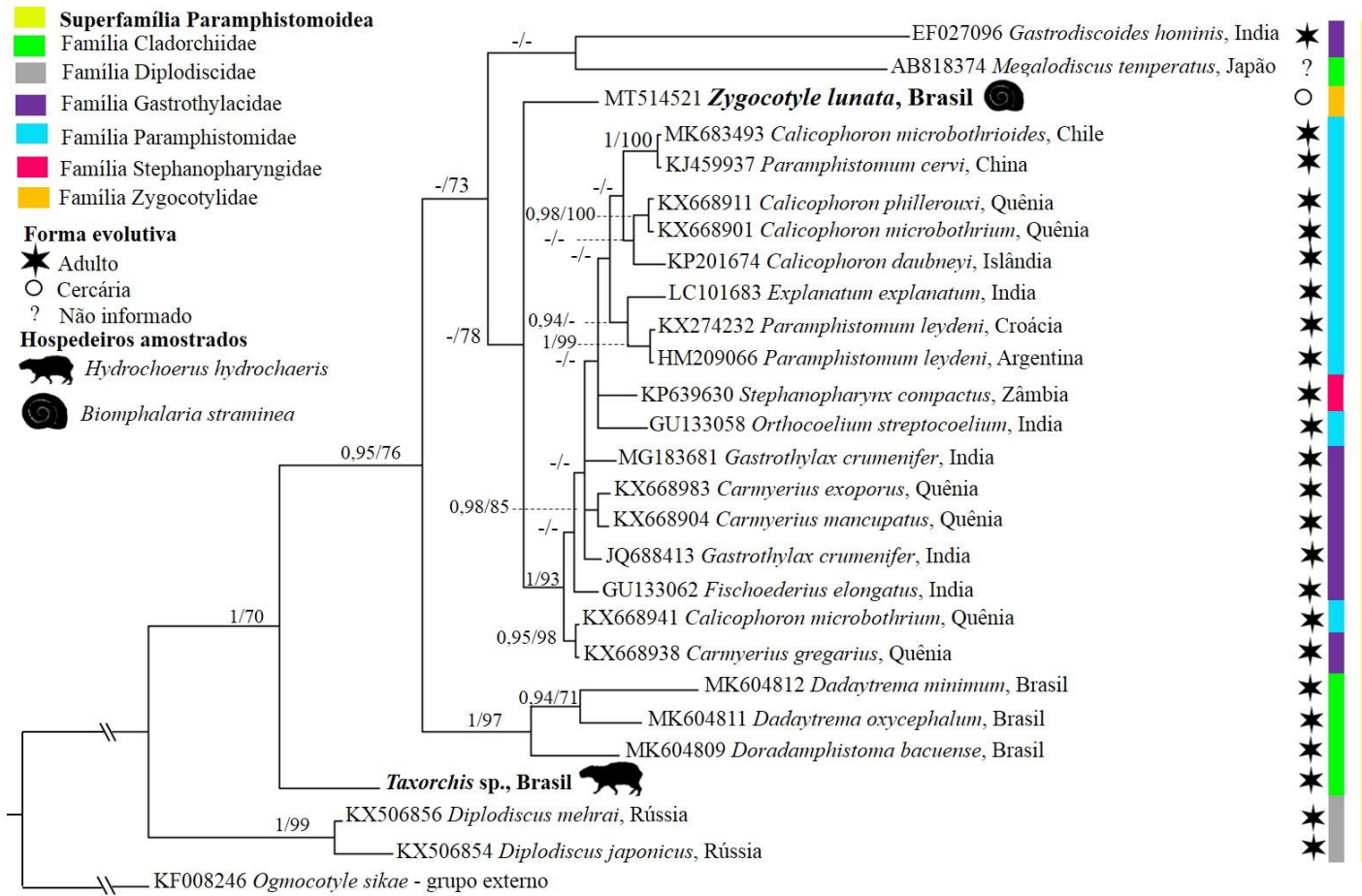
Biologia molecular

Com o material genético obtido de *Taxorchis* sp. foi possível se obter sequências dos genes ITS-2 (396 pb, 27 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: K2+I com 53 parâmetros) e COI região pós-barcode (744 pb, 20 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: HKY+G com 42 parâmetros). Em relação ao ITS-2, a espécie com menor divergência foi *Chiorchis fabaceus* (MF370224) (9,2%), pertencente à família Cladorchiidae, amostragem oriunda de um peixe-boi da Colômbia (obtido a partir de ovos de material fecal sem análise morfológica do adulto-ver VÉLEZ *et al.*, 2018). Por outro lado, comparando-se as espécies de cladorquiídeos parasitos de animais de sangue frio (peixes e anfíbios), as diferenças foram maiores (11,48-16,41%). Interessantemente, *Taxorchis* sp. apresentou maior similaridade com paranfistomídeos parasitos de ruminantes e cervídeos (90,3% com a espécie *Calicophorum microbothrium* (GU735651), 89,3% com *Paramphistomum leydeni* (HM209066 e KX274232), 88,8% com *P. cervi* (KJ459937); seguido dos cladorchiídeos de peixes da América do Sul: 89,8% com *Dadaytemoides parauchenipteri*, 88,3% com *Dadaytrema gracilis* (MK604810), 87,4% na comparação com *D. minimum* (MK604812) e 87,4% com *Diplodiscus japonicus* (Diplodiscidae- KX506854). Na análise filogenética, o espécime de *Taxorchis* sp. avaliado no presente estudo formou uma linhagem independente dos demais membros da família Cladorchiidae parasitos de peixes da América do Sul (FIGURA 27). Além disso, observou-se que membros de outras famílias abordadas demonstram ser parafiléticas, com necessidade de maiores estudos.

Na análise com o gene mitocondrial COI, foi possível obter poucas informações específicas, devido à escassez de sequências moleculares no *Genbank*, sendo as divergências interespecíficas na comparação com outros membros da família Cladorchiidae (14,91 a 15,93% referente a *D. oxycephalum* e *D. gracilis*- MN068091 e MK907336- parasitos de peixes) próximas às espécies pertencentes à família Paramphistomidae (15,59% referente a *P. cervi* KF475773- parasito de bovívdeo selvagem). Na análise filogenética com o marcador COI, *Taxorchis* sp. formou uma linhagem independente se comparado aos outros cladorchiídeos. Além disso, observou-se que outros membros dessa superfamília selecionados demonstraram ser parafiléticas, com formação de clados sem ou com baixos valores de suporte (FIGURA 28).

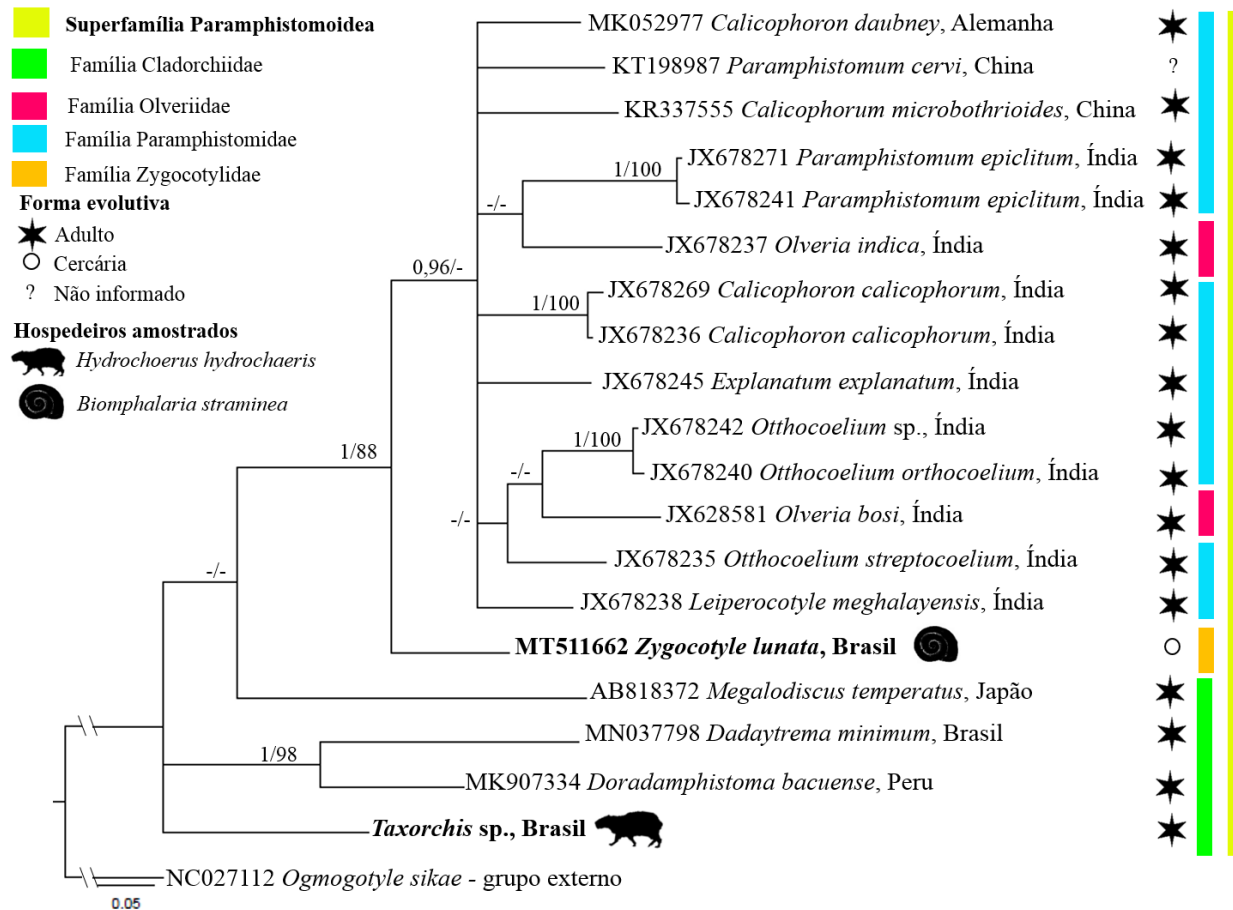
Tentativas de se obter sequências do gene 28S utilizando-se os primers Dig-12/1500R não lograram em sucesso.

Figura 27. Árvore filogenética gerada com utilização de sequências dos alinhamentos de DNA ribossomal ITS-2 de trematódeos da superfamília Paramphistomoidea



Legenda: Os suportes nodais para Inferência Bayesiana foram considerados aqueles iguais ou acima de 90 e, para Máxima Verossimilhança, considerados valores de suporte igual ou acima de 70. Asteriscos referem-se a nodos inexistentes na árvore filogenética com utilização do método de Máxima Verossimilhança. Em negrito encontram-se as sequências do presente estudo.

Figura 28. Árvore filogenética gerada com utilização de sequências dos alinhamentos de DNA mitocondrial Citocromo Oxidase região pós barcode de trematódeos da superfamília Paramphistomoidea



Legenda: Os suportes nodais para Inferência Bayesiana foram considerados aqueles iguais ou acima de 90 e, para Máxima Verossimilhança, considerados valores de suporte igual ou acima de 70. Asteriscos referem-se a nodos inexistentes na árvore filogenética com utilização do método de Máxima Verossimilhança. Em negrito encontram-se as sequências do presente estudo.

5.7.2.7 *Zygocotyle lunata* (Diesing, 1836) (Paramphistomoidea: Zycocotylidae)

Resenha taxonômica

Forma evolutiva: cercária, metacercária e adulto.

Hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Tipo cercariano: Anfistoma.

Prevalência: 0,05% (1/1.861) no total e 0,36 % entre espécimes de *B. straminea* infectados (1/275) (coletas regulares).

Hospedeiros definitivos naturais: anseriformes domésticos.

Prevalência: 55% (11/20- HPJ).

Hospedeiro definitivo experimental: *M. musculus*.

Prevalência: 100% (4/4).

Sítio de infecção: intestino grosso (hospedeiro experimental- ceco e porção inicial do cólon transversal).

Morfologia

Cercárias (FIGURA 29 A): *in vivo* são larvas muito ativas, com emergência pela manhã após fotoestimulação e rápido encistamento nas paredes dos poços de poliestireno e nas conchas dos moluscos. Corpo cercariano oval, fortemente pigmentado. Abertura oral seguida de faringe musculosa, com e dois divertículos em sua porção posterior. Presença de dois ocelos pigmentados na porção anterior. Acetábulo desenvolvido na extremidade posterior. Cauda simples, longa.

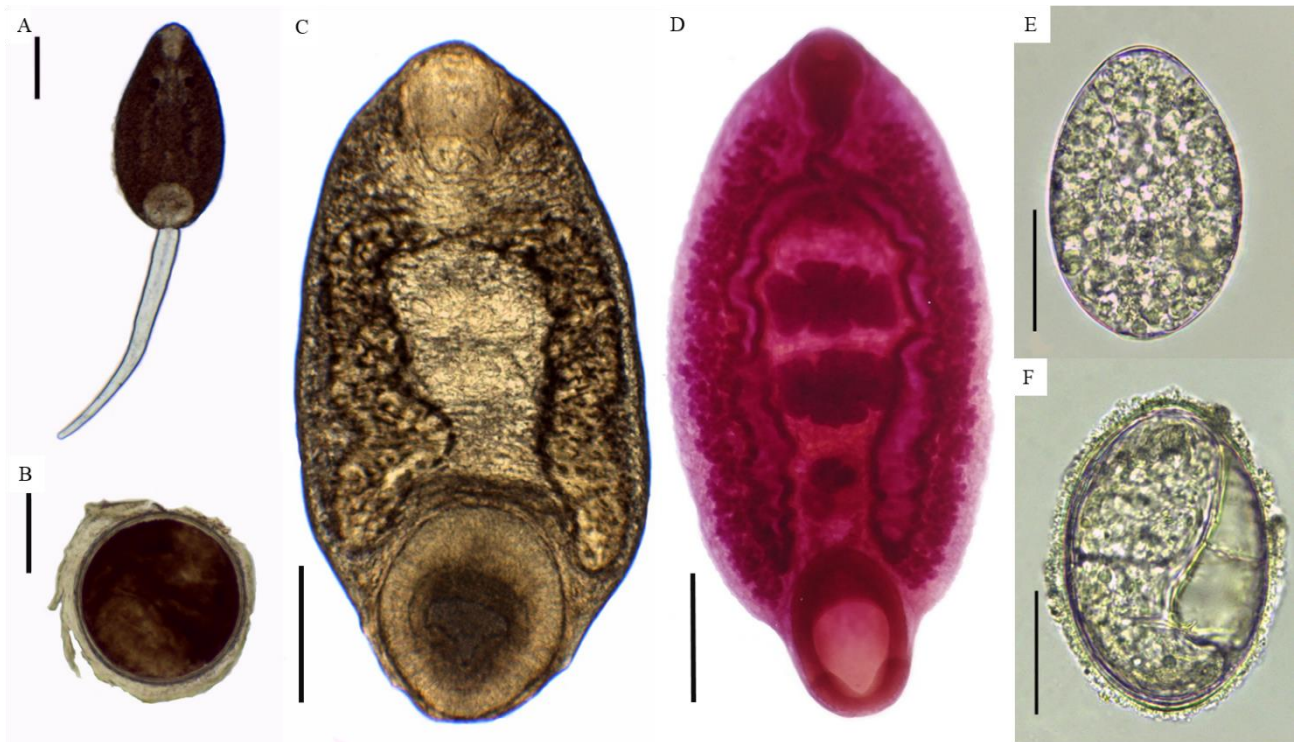
Metacercárias (FIGURA 29 B): desenvolvidas, medindo aproximadamente 300µm, de formato esférico, pigmentadas, parede cistogênica espessa formada por várias camadas, espessura que varia entre 50 e 70µm.

Adultos (FIGURA 29 C e D): *in vivo* apresentam coloração rósea, corpo alongado, muito ativos, com ventosa muitas vezes observada fortemente fixada à mucosa intestinal. Trematódeos adultos corados com carmim: corpo alongado, de forma ovalada. Faringe terminal com dois apêndices na parte posterior da estrutura e laterais. Esôfago curto, com pequeno bulbo presente antes da bifurcação intestinal. Cecos lisos, sem divertículos, estendendo-se até a base da ventosa ventral. Acetábulo muito desenvolvido, musculoso, situado na porção posterior do corpo com estrutura presente na borda posterior. Testículos localizados medianamente, intercecal, em tandem e lobulados. Ovário mediano, arredondado, pós-testicular. Vitelárias foliculares, localizadas nas laterais do corpo, extra-cecais e cecais, estendendo-se desde os apêndices da faringe, até o terço inicial da

ventosa ventral. Alças uterinas sinuosas e intercecais. Glândula de Mehlis e complexo reprodutivo acima do ovário. Vesícula seminal longa, fina e sinuosa com poro genital localizado pós bifurcação intestinal. *Ovos*: foram obtidos pelo exame parasitológico HPJ a partir das fezes dos camundongos infectados. Apresentam coloração clara, formato ovalado, operculados, não embrionados, apresentando na extremidade contrária à opercular uma pequena protuberância na maioria dos exemplares (FIGURA 29 E). Medem $133 \pm 4,58$ (125-141) μm de comprimento e $93 \pm 9,0$ (79-107) μm de largura. Quando incubados por 15 dias apresentam miracídio sem ocelos (FIGURA 29 F).

Observações: Devido a essa espécie de digeneico ser amplamente conhecida e com vasto estudo morfológico semelhante aos espécimes aqui estudados (TRAVASSOS *et al.*, 1969; OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.*, 2011; BARBOSA, 2011), não foi realizada análise morfométrica mais detalhada. Como nota, assim como outros paranfistomoides, *Z. lunata* apresenta dois hospedeiros (intermediário e definitivo), tendo como hospedeiro intermediário os moluscos pulmonados aquáticos, onde ocorre reprodução assexuada com produção de cercarias do tipo Anfistoma, que emergem no meio aquático e encistam em substratos. Já foram relatados como hospedeiros definitivos, aves e mamíferos (TRAVASSOS, FREITAS & KOHN, 1969; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, SPATZ & CAPP, 2003; OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.*, 2011), sendo possível no presente trabalho a associação entre formas larvais e formas adultas por estudo experimental, como também pela análise do material fecal dos anseriformes domésticos presentes na LCADM-MG, neste último caso, com encontro de ovos com morfologia semelhante aqueles obtidos das fezes de camundongo.

Figura 29. Formas evolutivas de *Zygodotyle lunata* provenientes de *Biomphalaria straminea* e experimentalmente em *Mus musculus*



Legenda: A) Cercária recuperada de *Biomphalaria straminea*. B) Metacercária retirada de placa de poliestireno. C) Espécime obtido aos 15 dias após infecção experimental de *Mus musculus*. D) Espécime obtido aos 40 dias após infecção no mesmo hospedeiro, corado e montado em lâmina permanente. E) ovo obtidos de exame parasitológico de fezes a fresco. F) Ovo após incubação, com miracídio no interior. Escalas: A-200 μ m, B- 100 μ m, C-1mm, D- 500 μ m, E e F- 50 μ m.

Biologia molecular

Para a análise molecular de *Z. lunata*, foram utilizados dois marcadores ribossômicos, sendo o 28S (1285 pb, 30 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: K2+G com 59 parâmetros) e ITS-2 (418 pb, 27 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: K2+I com 53 parâmetros) e o marcador mitocondrial COI com dois pares de primers distintos [1° par: 123F e 858R (561pb, 20 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: TN93 +G com 45 parâmetros); 2° par: JB3 e Coi1RTrema (872 pb, 20 sequências selecionadas, modelo de substituição nucleotídica: HKY+G com 42 parâmetros)]. Na análise de comparação pareada com o marcador 28S, o único membro da família Zygodontylidae com sequências no *Genbank* (*Wardius zibethicus*- JQ67084) apresentou similaridade de 97,7% com *Z. lunata*. Além disso, em comparação com outros membros da superfamília Paramphistomoidea, duas famílias apresentaram similaridades de sequências acima de 94%, sendo elas: 1) Paramphistomidae com, por exemplo, as espécies *P. epiclitum* (96,5%), *P. cervi* (96,2%), *Orthocoelum orthocoelum* (95,9%) e *Leiperocotyle meghalayensis* (94,3%); 2) Gastrothylacidae: *Gastrothylax crumenifer* (96,3%); *Fischoederius elongatus* (96,2%); Gastrodiscidae: *Homalogaster poloniae* (95,6%) e *Gastrodiscoides hominis* (95,6%). Já as demais famílias em que foi possível obter dados para comparação, tiveram valores de similaridades menores que 92%. Na análise filogenética, houve a formação de clado bem suportado (1 IB/ 96 MV) entre *Z. lunata* e *W. zibethicus*, - corroborando com a classificação taxonômica atual que incluem estes dois representantes na família Zygodontylidae (FIGURA 30).

Em relação ao marcador ITS-2, este até o momento é a única sequência para a família Zygodontylidae e na análise filogenética, o haplótipo do presente estudo formou uma linhagem independente dos outros membros da superfamília (FIGURA 27).

Nas análises com marcador mitocondrial COI (561pb- região barcode) foi possível obter uma sequência de *Z. lunata* proveniente do Canadá com similaridade de 99,5% na comparação intraespecífica pareada, demonstrando coespecificidade. Além disso, em relação a demais membros da superfamília Paramphistomoidea, a comparação pareada revelou valores de divergência entre 14,6 e 17,7%. Na análise filogenética foi observado a formação de um clado com os dois isolados de *Z. lunata* com alto valor de suporte (1 IB/ 100 MV), mas quando ao comparar a topologia da árvore, observa-se que uma indefinição de membros determinados como sendo da mesma família pela morfologia se agruparem em distintos clados com suportes de baixo valor, formando uma politomia (FIGURA 31). Com o marcador COI (872pb), não foram encontradas sequências de

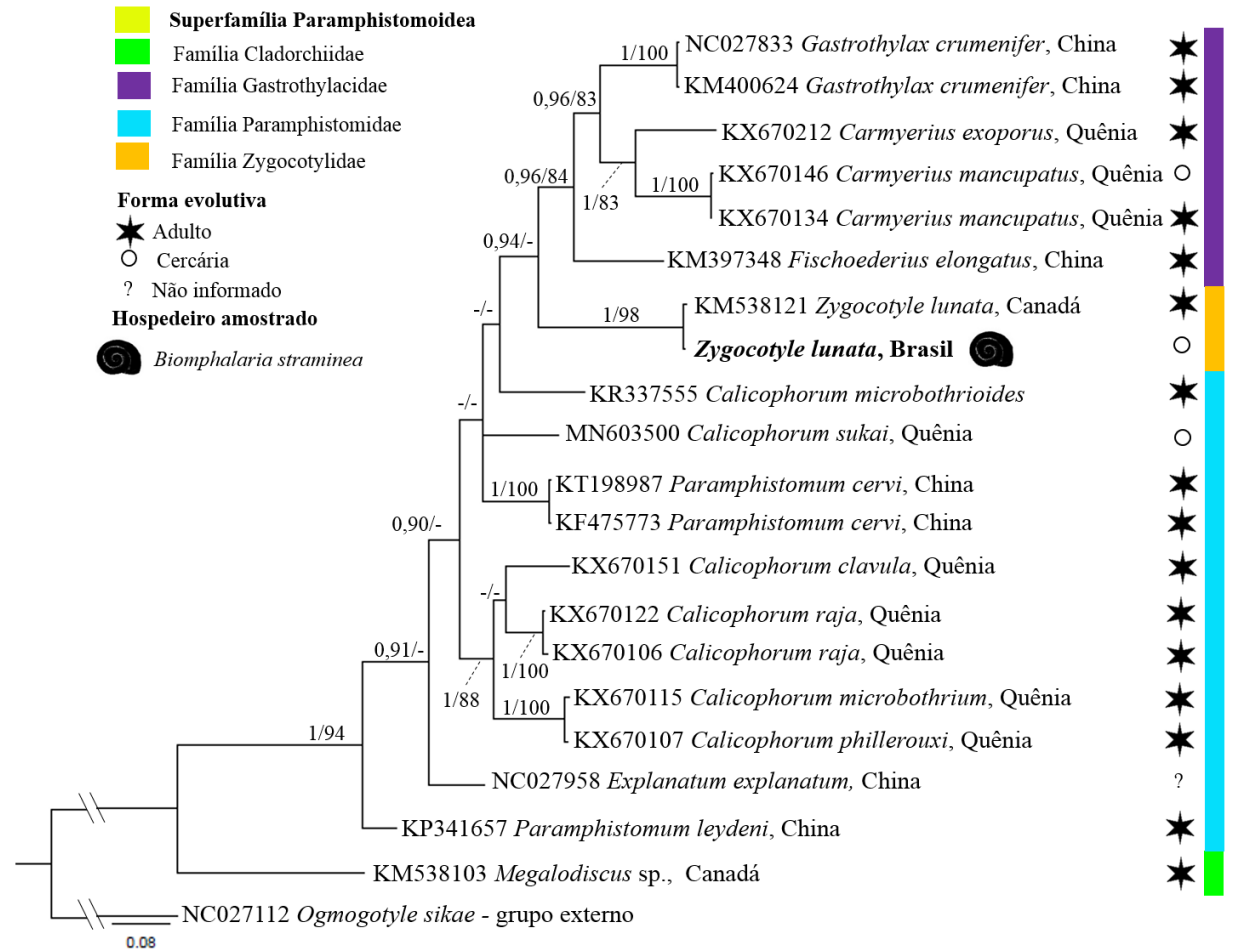
outros membros da família Zygomycetidae depositadas no *GenBank*, entretanto, pôde-se observar na análise filogenética a formação de um clado independente com o isolado do presente trabalho, sendo bem suportado (1 IB/ 88 MV) (FIGURA 28).

Figura 30. Árvore filogenética gerada com utilização de sequências dos alinhamentos de DNA ribossomal 28S de trematódeos da superfamília Paramphistomoidea



Legenda: Os suportes nodais para Inferência Bayesiana foram considerados aqueles iguais ou acima de 90 e, para Máxima Verossimilhança, considerados valores de suporte igual ou acima de 70. Asteriscos referem-se a nodos inexistentes na árvore filogenética com utilização do método de Máxima Verossimilhança. Em negrito encontram-se as sequências do presente estudo.

Figura 31. Árvore filogenética gerada com utilização de sequências dos alinhamentos de DNA mitocondrial Citocromo Oxidase região barcode de trematódeos da superfamília Paramphistomoidea



Legenda: Os suportes nodais para Inferência Bayesiana foram considerados aqueles iguais ou acima de 90 e, para Máxima Verossimilhança, considerados valores de suporte igual ou acima de 70. Asteriscos referem-se a nodos inexistentes na árvore filogenética com utilização do método de Máxima Verossimilhança. Em negrito encontram-se as sequências do presente estudo.

5.7.2.8 *Hippocrepis hippocrepis* (Diesing, 1850) (Pronocephaloidea: Notocotyliidae)

Resenha taxonômica

Forma evolutiva: cercária, metacercária e adulto.

Hospedeiro intermediário: *B. straminea*

Tipo cercariano: Monostoma

Prevalência: 12,30% (229/1.861) no total e 83,3% entre os infectados (229/275) (coletas regulares).

Hospedeiros definitivos: *H. hydrochaeris*.

- 1) Exemplar 1: macho jovem-adulto (aproximadamente 35kg).

Número de trematódeos recuperados: 428 espécimes.

Sítio de infecção: cólon transverso, descendente e porção inicial do reto.

- 2) Exemplar 2: fêmea jovem (aproximadamente 15kg).

Número de trematódeos recuperados: aproximadamente 1.300 espécimes.

Sítio de infecção: cólon transverso, descendente e porção inicial do reto.

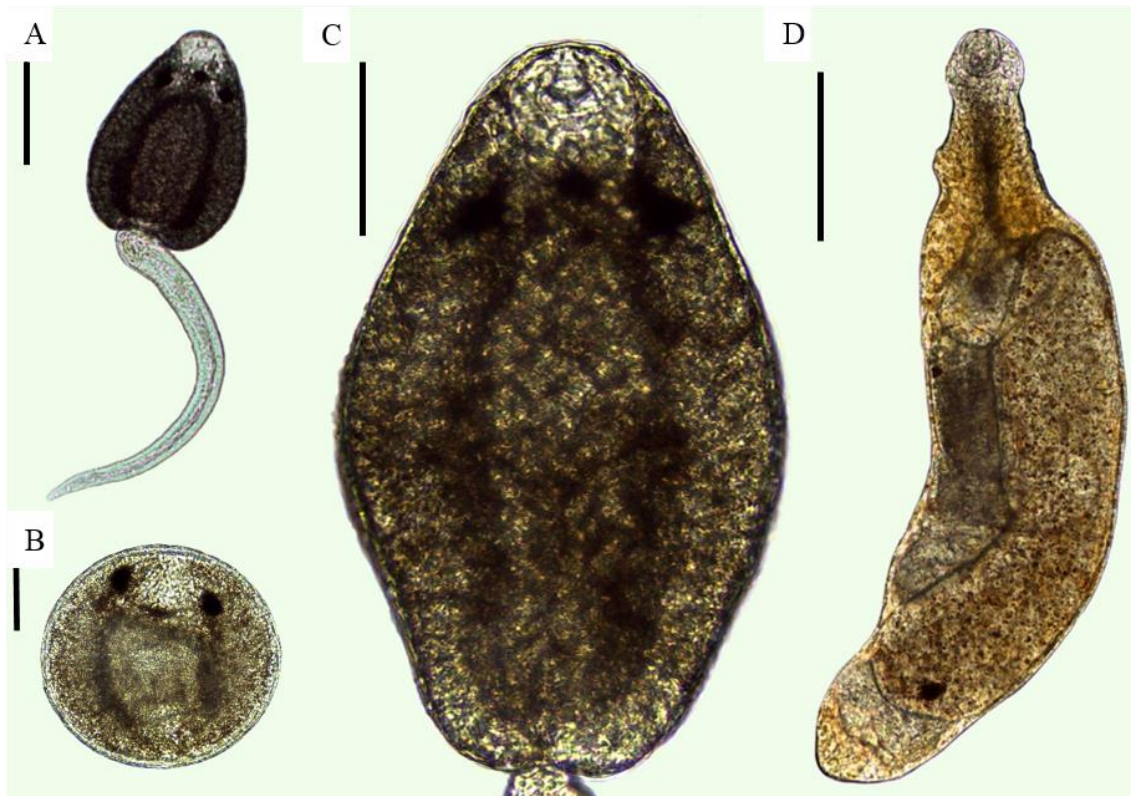
Morfologia

Cercárias: larvas muito ativas, emergindo na maioria das vezes em grande quantidade após fotoestimulação, com processo de encistamento nas paredes do poço de poliestireno e nas conchas de moluscos. Possuem coloração marrom a acastanhada, ventosa oral subterminal, faringe e ventosa ventral ausentes. Presença de três ocelos pigmentados, sendo dois maiores lateralizados e um menor entre os mesmos. Células cistogênicas numerosas. Cauda simples (FIGURA 32 A e C).

Metacercárias: coloração marrom, parede cística espessa formada por várias camadas (FIGURA 32 B).

Rédias: alongadas, sem apêndices locomotores, de coloração amarelo laranjada, com faringe e ceco largo e longo, apresentando material amarronzado e uma mancha escura na sua porção posterior. Massas germinativas localizadas na extremidade posterior e cercárias imaturas ao longo do corpo, laterais ao ceco. Poro de nascimento lateral, na porção anterior, na altura da faringe (FIGURA 32 D).

Figura 32. Formas imaturas de *Hippocrepis hippocrepis* obtidas de *Biomphalaria straminea* provenientes da LCADM-MG



Legenda: A) Cercárias do tipo monostoma obtidas de *B. straminea*. B) Metacercária encistada. C) Corpo cercariano com detalhes da ventosa oral, ocelos e congregações circulares. D) Rédia madura evidenciando faringe na porção anterior, seguindo com ceco sacular e observação de cercaria lateralizada ao órgão. Lado esquerdo: abaixo da faringe observa-se poro de nascimento (protuberância). Escalas: A- 100 μ m, B e C- 50 μ m, D- 200 μ m.

Adultos (N=30): *in vivo* são alongados, possuem coloração avermelhada a rosada, pouco ativos. Corados e montados em lâminas permanentes: alongados, ventosa oral subterminal, com duas papilas laterais. Faringe e acetábulo ausentes, Esôfago muito curto. Ceco longo, sinuoso, com divertículos, unindo-se posteriormente entre os testículos e terminando na região posterior do corpo. Poro genital mediano, pós- bifurcal (FIGURA 33 A). Saco do cirro bem desenvolvido e alongado, com cirro longo e espinhoso (FIGURA 33 B). Testículos opostos, lobados, simétricos, separados pela unificação cecal, localizados na extremidade posterior do corpo. Ovário mediano, pré-testicular e

intercecal. Glândula de Mehlis localizada logo acima do ovário, de posição intercecal. Útero sinuoso, com alças transversais, com localização cecal e intercecal, estendendo-se desde o terço anterior até acima da glândula de Mehlis. Vitelária bilateral, formada por pequenos folículos no terço, no terço posterior do corpo, acima dos testículos. Ductos vitelínicos transversais visualizados a partir dos últimos folículos vitelínicos posteriores, unindo-se na região central da glândula de Mehlis. Em alguns espécimes, poucas glândulas ventrais foram verificadas na região posterior. Poro excretor na extremidade final. Tegumento contendo fileiras de espinhos mais desenvolvidos na porção anterior (FIGURA 33 C). Ovos operculados, amarelados, pequenos, com um único filamento muito longo em cada polo (FIGURA 33 D) e no interior da cápsula, tem-se a presença de larva (FIGURA 33 E). Os ovos obtidos por dissecação intrauterina apresentam-se emaranhados, dificultando delimitação de filamentos e facilitando seu rompimento quando nas tentativas de desembaraça-los. Os ovos obtidos em material fecal fresco, apresentavam filamentos estendidos, facilitando a mensuração dos filamentos como um todo. Os dados morfométricos são apresentados na TABELA 15.

Observações: Como nota, trematódeos notocotilídeos apresentam dois hospedeiros, sendo um invertebrado molusco (reprodução assexuada), de onde emergem cercarias do tipo Monostoma, com formação de metacercárias no ambiente, e o hospedeiro definitivo (mamíferos e aves) onde ocorre a reprodução sexuada (TRAVASSOS, 1950; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003; GONCHAR *et al.*, 2019). No presente estudo, foi possível associar a forma adulta a forma larval por análise genética, com elucidação do ciclo biológico até então desconhecido. Em relação aos caracteres de diagnose do gênero *Hippocrepis* Travassos, 1922, estes se baseiam na junção dos ramos cecais posterior ao ovário, de modo a formar um único ceco curto, mediano (BARTON & BLAIR, 2005), com ovos apresentando um par de filamento polar (um em cada extremidade) na espécie *H. hippocrepis* (KOHN & PEREIRA, 1970), o que corrobora com a identificação morfológica no presente estudo.

Figura 33. Espécime adulto de *Hippocrepis hippocrepis* recuperado de *Hydrochoerus hydrochaeris* na LCADM-MG



Legenda: A) Espécime adulto. B) Cirro longo e espinhoso. C) Tegumento evidenciando escamas espinhosas. D) Ovo com longos filamentos polares. E) Detalhe de miracídio no interior do ovo. A- 100 μ m, B- 200 μ m, C- 20 μ m, D- 100 μ m, E- 20 μ m.

Tabela 15. Dados morfométricos obtidos de *Hippocrepis hippocrepis* obtidas de capivaras da LCADM-MG e dados reportados para *Hippocrepis* spp. da América do Sul por diferentes autores. Dados apresentados em micrometros (exceto quando indicados de outra forma). C: Comprimento, L: Largura

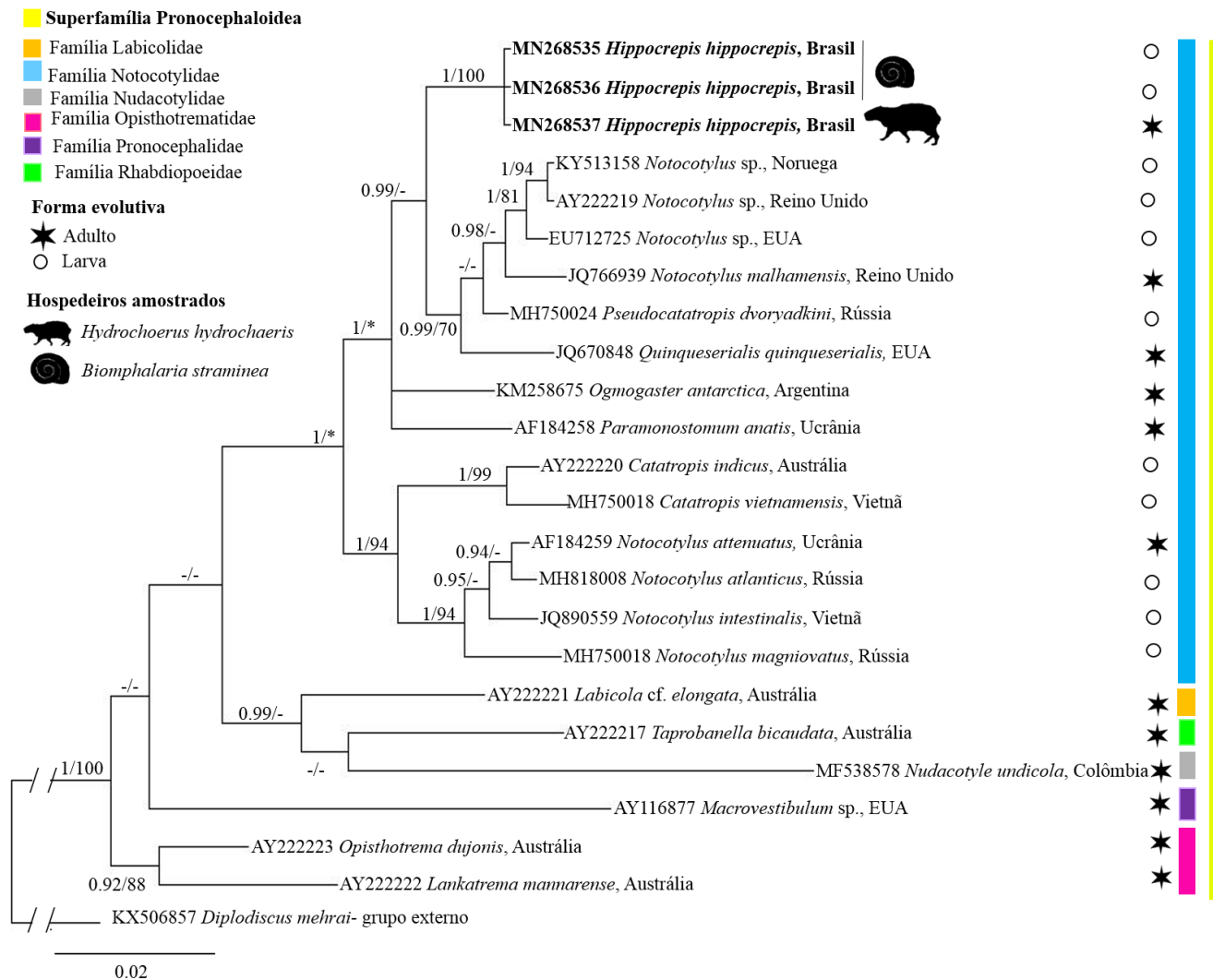
Espécies		<i>Hippocrepis hippocrepis</i>			<i>H. fuelleborni</i>	<i>H. myocastoris</i>
Referência	Presente estudo	Kohn & Pereira (1970)	Sutton <i>et al.</i> (1997)	Travassos & Vogelsang, (1930)	Flores <i>et al.</i> (2007)	
Hospedeiro	<i>H. hydrochaeris</i>	<i>H. hydrochaeris</i>	<i>H. hydrochaeris</i>	<i>Myocastor coypus</i>	<i>M. coypus</i>	
Localidade	Brasil	Brasil	Argentina	Uruguai	Argentina	
Corpo mm	C	7,9 ± 1,4 (6,0-10)	6 - 17,5	8,8 (2,93 – 11,9)	6 – 8	4,6 ± 0,85 (2,8-6,4)
	L	1,65 ± 0,27 (1,01-2,23)	1.3 -3,35	1,8 (0,71 – 2,5)	1 – 1,5	1,2 ± 0,26 (0,79-1,6)
Ventosa oral	C	593 ± 63 (453-714)	360 - 960	670 (320 - 890)	370 – 410	400 ± 60 (250-520)
	L	646 ± 115 (453-907)	480 – 1080	780 (280 - 850)	350 – 370	450 ± 60 (310-540)
Saco do cirro mm	C	2,6 ± 0,5 (1,8 – 3,4)	1,6-5,73	3,46 (1,04 – 4,81)	1,71 – 1,97	1,29 ± 0,28 (0,76-2,17)
Testículo Anterior	C	737 ± 105 (485-1052)	680-1600	750 (300-980)	710 – 850	620 ± 90 (400-810)
	L	549 ± 98 (329-729)	480-1060	580 (240-860)	620 – 710	420 ± 70 (280-520)
Testículo Posterior	C	740 ± 145 (379-961)	680-1380	740 (270 - 910)	710 – 850	610 ± 110 (360-860)
	L	564 ± 115 (363-843)	480-860	550 (240 - 760)	620 – 710	400 ± 70 (280-520)
Ovário	C	280 ± 59 (186-400)	260 – 680	330 (90-430)	480 – 520	210 ± 40 (130-340)
	L	634 ± 90 (479-843)	480 – 900	480 (160 - 630)	310 – 420	370 ± 50 (250-450)
G. de Mehlis		230 ± 45 (143-336)	190 – 540	400 (310 - 460)	-	-
	L	448 ± 85 (300-593)	360-700	540 (430 - 600)	-	-
Ovos	C	22 ± 2 (19- 27)	18 – 23	20 (16-25)	27 – 29	26 ± 1 (24-26)
	L	12 ± 1 (11- 16)	9 -14	10 (9-10)	13	13 ± 1 (12-14)
Filamentos ovos	C	389 ± 36 (314-454)	141-149	-	Ausente	54 ± 16 (19-72)

Biologia molecular

Com a utilização dos marcadores 28S (1172 pb) e COI (777 pb) para os parasitos adultos recuperados de capivara e das cercárias do tipo monostoma provenientes de *B. straminea* foi possível obter uma similaridade de 100% para ambos os marcadores, realizando dessa forma, a associação da fase larvária com a fase adulta. Com o marcador 28S, houve divergência entre 1,6-3,8% em relação outras 13 sequências pertencentes a trematódeos da família Notocotylidae depositadas no *Genbank*. Na análise filogenética deste marcador, foi possível observar o agrupamento de *H. hippocrepis* do presente trabalho em um clado com alguns representantes da família Notocotylidae (*Notocotylus*, *Pseudocatropis*, *Quinqueserialis*, *Ogmogaster*, *Paramonostomum* e *Catatropis*) (FIGURA 34).

Em relação ao marcador COI, existem apenas três sequências da família Notocotylidae disponíveis no *Genbank* (*Ogmocotyle antarctica*, *O. sikae* e *Tristiata anatis*). Valores de divergência molecular entre *H. hippocrepis* e estes isolados foram entre 11,4 e 17,4%.

Figura 34. Árvore filogenética gerada com utilização de seqüências dos alinhamentos de DNA ribossomal 28S de trematódeos da superfamília Pronocephaloidea



Legenda: Os suportes nodais para Inferência Bayesiana foram considerados aqueles iguais ou acima de 90 e, para Máxima Verossimilhança, considerados valores de suporte igual ou acima de 70. Asteriscos referem-se a nodos inexistentes na árvore filogenética com utilização do método de Máxima Verossimilhança. Em negrito encontram-se as seqüências do presente estudo.

5.8 Trematódeos identificados exclusivamente por morfologia

5.8.1 *Apharyngostrigea* sp. (Diplostomoidea: Strigeidae)

Resenha taxonômica

Forma evolutiva: metacercária.

Hospedeiro intermediário invertebrado: não identificado.

Hospedeiro intermediário vertebrado: *P. reticulata*

Sítio de infecção: cavidade corporal.

Prevalência: 16,66% (1/6).

Hospedeiro definitivo: não identificado.

Morfologia

Metacercária: o único cisto de *Apharyngostrigea* sp. recuperado da cavidade de *P. reticulata*. Cisto de formato piriforme, coloração marrom, parede cística muito espessa com distintas camadas (FIGURA 35 A). Possui as seguintes medidas: 1.111,20µm de comprimento total e 885,76µm de largura total; 732,94µm de comprimento e 448µm ao se considerar apenas a parede interna.

5.8.2 *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Ophistochioidea: Heterophiidae)

Resenha taxonômica

Forma evolutiva: cercária e metacercária.

Primeiro hospedeiro intermediário: *M. tuberculata*.

Tipo cercariano: Pleurolofocerca.

Prevalência: 0,06% (6/4.545).

Segundo hospedeiro intermediário: *P. reticulata*.

Sítio de infecção: brânquias.

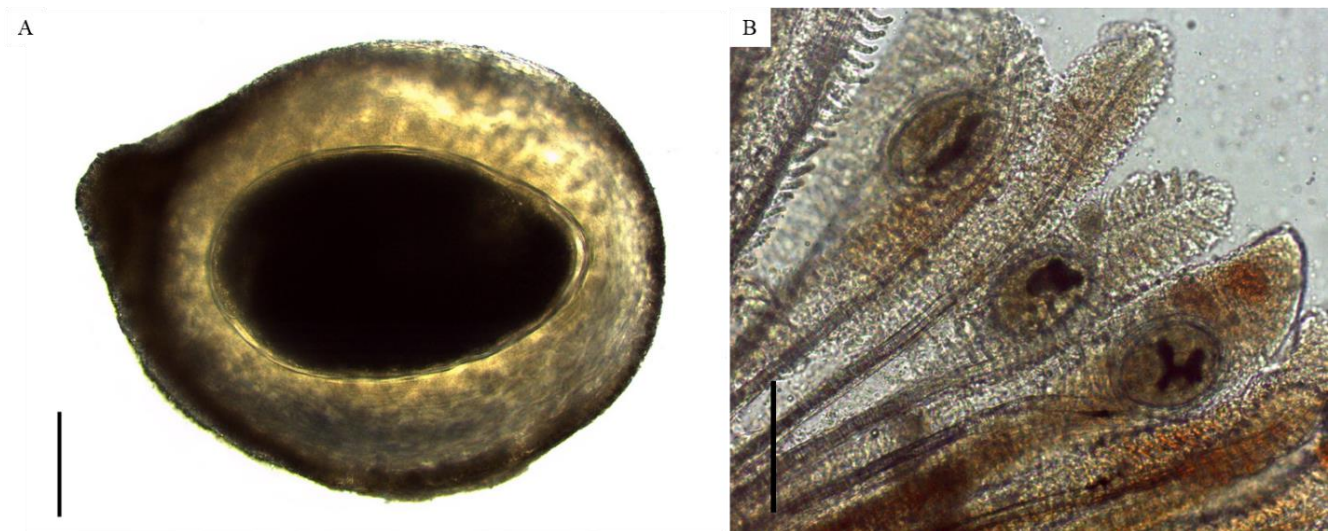
Hospedeiro definitivo: não identificado.

Morfologia

Cercárias: larvas *in vivo* muito ativas, emergindo após fotoestimulação artificial em grande quantidade, sem encistamento nas placas de poliestireno. Cauda presente, simples, longa, corpo cercariano anterior a cauda, ventosa oral subterminal com presença de

pequenos espinhos, seguida de faringe desenvolvida, ventosa ventral presente, pouco desenvolvida, localizada na região mediana do corpo, presença de um par de ocelos pigmentados, cauda lisa com presença de membrana natatória dorsoventral. *Metacercárias*: localizadas encistadas nas brânquias de *P. reticulata*. Cisto de parede espessa, com formato ovalado, no interior pôde ser observado coroa de espinhos e vesícula excretora desenvolvida em forma de X (FIGURA 35 B). Devido ao digeneico ser amplamente conhecido, com descrições morfológicas e moleculares já realizadas com isolados de Belo Horizonte (PINTO & MELO 2012; PINTO, 2013; PINTO *et al.*, 2018), não foram realizados estudos mais aprofundados com essa amostra.

Figura 35. Metacercárias recuperadas de *Poecilia reticulata* proveniente da LCADM-MG



Legenda: A) Cisto de *Apharingostrigea* sp. B) Cisto de *Centrocestus formosanus* em brânquias.
Escalas: 200 μ m.

5.8.3 *Drepanocephalus* sp. (Echinostomatoidea: Echinostomatidae)

Resenha Taxonômica

Forma evolutiva: cercária.

Primeiro hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Tipo cercariano: Equinostoma.

Prevalência: total de 0,16% (3/1.861) e entre os infectados de 1,10% (3/275) (coletas regulares).

Segundo hospedeiro intermediário: não encontrado.

Hospedeiro definitivo: não identificado.

Morfologia

Cercárias (FIGURA 36 A e B): *in vivo* são larvas muito ativas, emergindo durante o período noturno, sem encistamento nas placas de poliestireno. Cauda longa e simples, corpo cercariano anterior à cauda, coberto de espinhos, presença de ventosa ventral e colar cefálico contendo aproximadamente 27 espinhos. Ventosa oral subterminal, desenvolvida, pré-faringe longa, faringe musculosa (menor que a ventosa oral), localizada abaixo da linha do colar cefálico. Esôfago longo, bifurcando-se na borda anterior da ventosa ventral, de onde partem os ramos cecais, estes, alcançam a região posterior do corpo. Ventosa ventral desenvolvida, localizada na região pós-equatorial, maior que a ventosa oral e faringe. Concreções circulares desenvolvidas, circulares, localizadas no terço mediano do corpo.

Observações: Trematódeos com essas características foram identificados anteriormente infectando *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* na lagoa da Pampulha, sendo correspondentes ao mesmo gênero (PINTO, 2013; PINTO *et al.*, 2016).

5.8.4 *Renicola* sp. (*Microphalloidea: Rencolidae*)

Resenha taxonômica

Forma evolutiva: cercária.

Primeiro hospedeiro intermediário: *M. tuberculata*.

Tipo cercariano: Gimnocéfala.

Prevalência: total de 0,04% (2/4.545) e de 1,60% entre os espécimes infectados (2/80) (coletas regulares).

Hospedeiro definitivo: não identificado.

Morfologia

Cercárias (FIGURA 36 C e D): *in vivo* são larvas muito ativas, emergindo após fotoestimulação artificial, sem encistamento nas placas de poliestireno. Coloração amarronzada, cauda simples e corpo coberto por espinhos. Ventosa oral subterminal, ventosa ventral presente e desenvolvida, localizada na região pré-equatorial do corpo. Vesícula excretora em forma de Y, iniciando-se próxima à linha mediana da ventosa ventral e unindo-se posteriormente até próximo à extremidade posterior do corpo. Cauda lisa.

Observações: Anterior estudo taxonômico foi realizado por Pinto & Melo (2012) com o mesmo tipo cercariano emergido de *M. tuberculata* proveniente da lagoa da Pampulha, ao qual, foi obtido parte do ciclo biológico em laboratório, com recuperação de metacercárias após infecção de peixes da espécie *P. reticulata*, sendo identificada a espécie *Renicola* sp.

5.8.5 *Spirorchiidae* gen. sp. (*Schistosomatoidea*: *Spirorchiidae*)

Resenha taxonômica

Forma evolutiva: cercária.

Primeiro hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Tipo cercariano: Distoma Brevifurcada Afaringeada.

Prevalência: total de 0,21% (4/1.861) e de 1,45% entre os infectados (4/275) (coletas regulares).

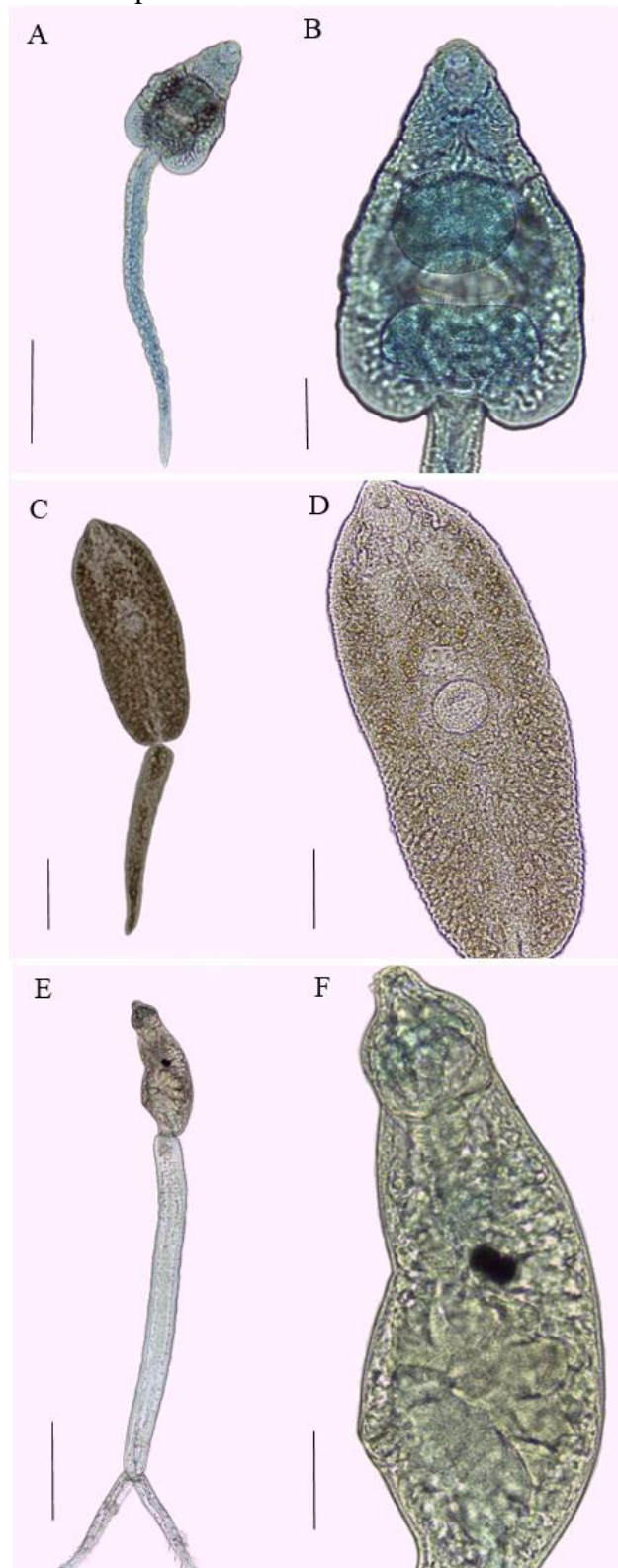
Hospedeiro definitivo: não identificado.

Morfologia

Cercárias (FIGURA 36 E e F): *in vivo* são larvas muito ativas, com intensa emergência durante o dia após fotoestimulação artificial. Corpo cercariano anterior à cauda, coloração clara, presença de ocelos, ventosa ventral localizada na região mediana do corpo. Cauda com membranas natatórias e espinhos, furca menor que a metade do tronco caudal (brevifurcada).

Observações: Essas larvas são encontradas em moluscos gastrópodes, produzidas em esporocistos por representantes da família *Spirorchiidae*, parasitos sanguíneos de quelônios. A transmissão se dá ativamente por penetração da derme e mucosas do hospedeiro vertebrado (PINTO *et al.*, 2015).

Figura 36. Larvas encontradas exclusivamente em moluscos provenientes da LCADM-MG



Legenda: A e B) *Drepanocephalus* sp. C e D) *Renicola* sp. E e F) Spirorchiidae gen. sp. Escalas: A e C- 200 μ m. B, D, F- 50 μ m. E- 100 μ m μ m

5.9 Trematódeo não identificado infectando anseriformes domésticos

Hospedeiro intermediário: não identificado.

Hospedeiros definitivos:

- 1) *Anas platyrhynchos domesticus* (exame parasitológico de fezes- HPJ)

Prevalência: 12,5% (1/8).

Sítio de infecção: provavelmente intestino.

- 2) *Cairina moschata domestica* (exame parasitológico de fezes- HPJ)

Prevalência: 27,66% (13/47).

Sítio de infecção: provavelmente intestino.

Morfologia

Ovos (N=20): ovos de coloração amarelo escura, formato elíptico, não embrionados, sendo as massas germinativas menores se comparadas segundo ovo, com zigoto correspondente a uma massa amorfa anterior à região equatorial. Medem $113\mu\text{m} \pm 4,8$ (103-121 μm) de comprimento, por $70\mu\text{m} \pm 1,58$ (68-73 μm) de largura.

Observações: Até o momento, segundo as análises e comparação com dados da literatura, esses ovos assemelham-se a ovos de trematódeos pertencentes à família Strigeidae (BASCH, 1969; BASCH *et al.*, 1973; SMITH e HICKMAN, 1983), sendo que, cercárias e metacercárias de *Cotylurus* sp. já foram encontradas infectando *B. straminea* no ponto de coleta onde concentram-se os anseriformes domésticos.

5.10 Resumo das espécies estudadas quanto a identificação taxonômica e ciclo de vida

No total, foi possível abordar no presente trabalho, 20 espécies de trematódeos, obtendo-se importantes informações sobre a biodiversidade e biologia dos mesmos em ambiente urbano. As informações taxonômicas e ecológicas das espécies encontradas, obedecendo a ordem alfabética a começar pelas Ordens, seguindo de membros pertencentes à mesma Super ordem, Superfamília e família, respectivamente, independente de hospedeiro. Uma compilação das espécies encontradas é apresentada no QUADRO 1.

Quadro 1. Compilação dos ciclos biológicos de trematódeos encontrados na Lagoa da cidade Administrativa de MG

Ordem	Subordem	Superfamília	Família	Menor classificação	Forma	Hospedeiros	Ciclo na		
Diplostomida	Diplostomata	Diplostomoidea	Diplostomidae	Crassiphialinae ge. sp.	Cercária	<i>B. straminea</i>	Indefinido		
				Diplostomidae gen. sp.	Cercária	<i>B. straminea</i>	Indefinido		
				<i>Hysteromorpha</i> sp.	Cercária	<i>B. straminea</i>	Indefinido		
				<i>Tylodelphys</i> sp.	MTC	<i>Hoplias malabaricus</i>	Indefinido		
			Strigeidae	<i>Apharyngostrigea</i> sp.	MTC	<i>Poecilia reticulata</i>	Indefinido		
				<i>Cotylurus</i> sp.	Cercária/MTC	<i>B. straminea</i>	Parcial		
		Schistosomatoidea	Clinostomidae	<i>Clinostomum</i> sp.	MTC	<i>Australoheros</i> sp.	Indefinido		
			Spirorchiidae	Spirorchiidae gen. sp.	Cercária	<i>B. straminea</i>	Indefinido		
Plagiorchiida	Echinostomata	Echinostomatoidea	Cyclocoelidae	<i>Cyclocoleum mutabile</i>	Adulto	<i>Gallinula galeata</i>	Indefinido		
			Echinostomatidae	<i>Typ. cucumerinum</i>	Cerc/MTC/Ad	<i>B. straminea</i> e anatódeos	Completo		
				<i>Echinostoma</i> sp.	Adulto	<i>Gallinula galeata</i>	Indefinido		
				<i>Drepanocephalus</i> sp.	Cercária	<i>B. straminea</i>	Indefinido		
			Fasciolidae	<i>Fasciola hepatica</i>	Adulto	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Indefinido		
			Philophthalmidae	<i>Philophthalmus gralli</i>	Cerc/MTC/Ad	<i>M. tuberculata</i> , <i>Gallinula galeata</i> e anatódeos	Completo		
			Pronocephalata	Paramphistomoidea	Cladorchiidae	<i>Taxorchis</i> sp.	Adulto	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Indefinido
					Zygocotilidae	<i>Zygocotyle lunata</i>	Cercária, MTC e adulto	<i>B. straminea</i> , anatódeos e <i>Mus musculus</i> (experimental)	Completo
	Pronocephaloidea	Notocotylidae		<i>Hippocrepis hippocrepis</i>	Cercária,	<i>B. straminea</i> e <i>Hydrochoerus</i>	Completo		
	Opistorchiata	Opistorchioidea	Heterophyidae	<i>Centrocestus formosanus</i>	Cercária e MTC	<i>M. tuberculata</i> e <i>Poecilia reticulata</i>	Parcial		
	Xiphidiata	Microcephaloidea	Renicolidae	<i>Renicola</i> sp.	Cercária	<i>M. tuberculata</i>	Indefinido		
	Xiphidiata	(?)	(?)	(?)	Cercária	<i>Pomacea</i> sp.	Indefinido		
	(?)	(?)	(?)	(?)	(?)	Ovo	Anatódeos	Indefinido	

6. DISCUSSÃO

Dentre os determinantes para a transmissão e perpetuação do ciclo de vida dos trematódeos digeneicos, estão fatores relacionados a presença de hospedeiros vertebrados e invertebrados susceptíveis, assim como o modo de vida, localização, dispersão e adaptação destes hospedeiros em distintos *habitats* (NELSON, 1960; SOULSBY, 1982; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). Ao longo do tempo, estudos sobre a biologia de trematódeos vêm assumindo importante papel para o conhecimento sobre a taxonomia e biodiversidade animal (DAYRAT, 2005; LITTLEWOOD, 2008; POULIN & PRESSWELL, 2016; POULIN *et al.*, 2020), assim como aspectos relacionados à ecologia parasitária (ANDERSON, 1978; MARCOGLIESE 2002, 2005; TAGLIORETTI *et al.*, 2018). Contudo, a elucidação de aspectos biológicos deste grupo de helmintos é na maioria das vezes complexa, visto que estes parasitos apresentam ciclo de vida heteroxeno, ou seja, envolve dois ou mais hospedeiros, sendo obrigatoriamente um molusco invertebrado e um vertebrado, o que implica em distintas fases de vida (parasitária e livre), assim como diferentes aspectos morfológicos em suas formas larvais e adultas (DAYRAT, 2005; BLASCO-COSTA & POULIN, 2017; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017).

Para tanto, no estudo taxonômico, ferramentas que a princípio se restringiam técnicas clássicas foram sendo desenvolvidas e, atualmente, a conexão com pesquisas a nível molecular vêm sendo considerada cada vez mais indispensável em pesquisas de estudo e delimitação de espécies, elucidação de ciclos biológicos, além de fatores relacionados à interação parasito/hospedeiro e evolução de parasitos, sendo denominada *Taxonomia Integrativa* (DAYRAT, 2005; WILL *et al.*, 2005; POULIN & PRESSWELL, 2016; GARCIA-VARELA *et al.*, 2016; BLASCO-COSTA *et al.*, 2016; BLASCO-COSTA & POULIN, 2017; BESPROZVANNYKH *et al.*, 2018; IZRAILSKAIA *et al.*, 2019). Ainda assim, existe uma grande lacuna no conhecimento da diversidade e biologia de trematódeos, principalmente nas regiões menos desenvolvidas economicamente, mas, em contraponto, que concentram a maior biodiversidade, a região tropical (SCHOLZ *et al.*, 2016; CHOUDHURY, *et al.*, 2016; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017; POULIN *et al.*, 2020).

No Brasil, apesar de mais de um século de estudos, apenas cerca de 50 espécies de trematódeos em suas formas larvais foram identificadas infectando 25 espécies de moluscos (PINTO & MELO, 2013ab), o que pode ser considerado uma parcela

extremamente pequena diante da diversa fauna de trematódeos adultos (764 espécies) e de moluscos (mais de 3000 espécies) registrados no país (COHEN *et al.*, 2020; SIMONE, 2020). Nesse sentido, o presente estudo fornece informações relevantes sobre aspectos da biologia de alguns trematódeos ocorrentes no país, sendo muitas das interações observadas até então desconhecidas. A análise de trematódeos recuperados diferentes tipos de hospedeiros intermediários e de vertebrados, neste último caso, envolvendo animais domésticos (anseriformes) e silvestres (capivaras, frango d'água, peixes) possibilitou e elucidação de interações biológicas. Assim, a contribuição da abordagem taxonômica integrativa para o avanço desta área do conhecimento pôde ser evidenciada.

Uma diversidade de trematódeos, composta por vinte e uma espécies foi encontrada no presente estudo realizado em um lago urbano de Belo Horizonte. O encontro de algumas espécies potencialmente zoonóticas ou parasitos de animais domésticos ocorrendo nesta coleção aquática deve ser considerado um alerta. De fato, a LCADM-MG, desde o ao final da década de 1960, historicamente possui importante papel para a população da região norte de Belo Horizonte. Atualmente, as coleções dulcícolas da região exercem importante papel na vida da população ali residente, seja como fonte de pesca, lazer, criações animais e pequenas plantações, como hortas e pomares. Além disso, o local é atualmente bastante utilizado para práticas esportivas e atividades de lazer no seu entorno, sendo a possibilidade de contato com as margens não pode ser negligenciado.

Com relação a fauna de moluscos encontradas durante o presente estudo, 5 espécies foram verificadas, sendo *B. straminea*, *M. tuberculata*, *Pomacea* sp., as mais abundantes e com maior diversidade de trematódeos. Outras duas espécies, *P. columella*, *Physa acuta* foram coletadas em pequeno número e não foram encontradas albergando larvas de trematódeos. Quanto a composição da malacofauna, estes resultados demonstram diferenças com relação a estudos prévios realizados na década de 1990, quando a coleção aquática era conhecida como Lago Serra Verde ou lagoa do hipódromo, quando foram registradas populações das *P. haustum*, *B. glabrata* e *B. tenagophila* (FREITAS *et al.*, 1991; FREITAS & SANTOS, 1995). Nesta época, a coleção aquática era uma reconhecida área de transmissão de esquistossomose em Belo Horizonte, o que provavelmente estava relacionado a ocorrência destes dois vetores, espécies com maior suscetibilidade e potencial de transmissão do *S. mansoni* (PARAENSE in CUNHA, 1970; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Ambas espécies não foram encontradas no presente estudo. Por outro lado, alterações estruturais foram realizadas na coleção aquática nas últimas décadas, especialmente quando da construção da Cidade Administrativa, o que

pode ter contribuído para o desaparecimento destas espécies e também para a eliminação do foco de esquistossomose, mas em contraponto contribuído para a instalação e manutenção de outras espécies, como *B. straminea* e o molusco invasor *M. tuberculata*. A ocorrência de *B. straminea* é aqui registrada na LCADM pela primeira vez. Esta foi a segunda espécie mais abundante no local 23,8% (2168/9108) e também a única espécie de planorbídeo encontrada na avaliação malacológica. A ausência de estudos malacológicos nos últimos 25 anos, dificultam a compreensão das alterações verificadas quanto a ocorrência de *Biomphalaria* spp. no local. É possível que a história relacionada aos vetores da esquistossomose na localidade se assemelhe ao verificado na represa da Pampulha (coleção aquática localizada a cerca de 10km da LCAMG), em que a introdução e dispersão de *B. straminea* foi verificada nas últimas décadas (PINTO, 2013).

Uma diversidade de trematódeos já foi registrada em *B. straminea* no Brasil, sendo composta até o momento por 16 espécies nominais, 6 gêneros, além do relato de 21 espécies baseadas apenas na forma cercariana (gênero *Cercaria* Müller 1773) e 7 grupos cercarianos com espécies não identificadas (PINTO & MELO 2013a; PINTO *et al.*, 2016; LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2018). No presente estudo, um total de nove espécies de trematódeos foram identificadas parasitando esses moluscos na LCADM-MG. Destas, quatro são registradas pela primeira vez em Belo Horizonte, Minas Gerais, a saber: 1) Crassiphialinae gen. sp.; 2) *Cotylurus* sp. (cercária e metacercária); 3) *Typhlocoelum cucumerinum* (cercária e metacercária) e 4) *Zygocotyle lunata*. Para se chegar à identificação destas espécies a partir de formas larvais, assim como a conexão entre formas evolutivas como observado em *Cotylurus* sp. e *T. cucumerinum*, foi imprescindível o uso de dados moleculares (no caso das três primeiras espécies) e também a realização de infecção experimental de hospedeiros vertebrados, realizada no estudo de *Z. lunata*. As demais espécies, Diplostomidae gen. sp., *Hysteromorpha* sp., Spirorchiidae gen. sp., *Drepanocephalus* sp., *H. hippocrepis* (apenas cercária do tipo Monostoma sem identificação específica) já foram relatadas anteriormente em estudo realizado também em Belo Horizonte (Lagoa da Pampulha) por Pinto (2013). Nenhum dos trematódeos identificados em *B. straminea* apresentam potencial zoonótico comprovado até o momento.

No presente estudo, foi possível alcançar a determinação específica de formas adultas de 6 espécies de trematódeos através das análises morfológicas e comparação com descrições existentes na literatura (com exceção de *Echinostoma* sp. e *Taxorchis* sp.). Do total de vinte e uma espécies de trematódeos estudadas na LCADM-MG, doze foram

encontradas no estágio de cercárias. Dessas, seis puderam ser conectadas a outras formas evolutivas na localidade sendo duas encontradas também como metacercárias (*Centrocestus formosanus* e *Cotylurus* sp.) e quatro espécies associadas tanto a metacercárias quanto aos adultos (*H. hippocrepis*, *P. gralli*, *T. cucumerinum* e *Z. lunata*). Além disso, três espécies (*Apharyngostrigea* sp., *Clinostomum* sp. e *Tylodelphys* sp.) foram identificadas apenas no estágio de metacercária em peixes da localidade. Esses dados demonstram a complexidade inerente ao estudo de trematódeos digenéticos em suas formas evolutivas.

Ademais, cinco espécies de trematódeos foram encontradas exclusivamente em hospedeiros intermediários, na forma de cercárias e metacercárias, em moluscos e peixes, sendo então realizados estudos morfológicos associados à biologia molecular. Dentre os membros da superfamília Diplostomoidea Poirier, 1886, quatro espécies foram reportadas, sendo: *Crassiphialinae* gen. sp., *Cotylurus* sp., *Hysteromorpha* sp. e *Tylodelphys* sp. Com exceção de *Tylodelphys* sp., os demais diplostomídeos citados fizeram parte do estudo de López-Hernández *et al.* (2019), onde dados morfológicos e moleculares foram utilizados para a identificação taxonômica. Embora não seja possível determinar o hospedeiro definitivo do isolado de *Cotylurus* sp. na LCADM-MG, chama a atenção, nos anseriformes estudados, o encontro de ovos de um trematódeo não identificado com medidas compatíveis com aqueles de alguns membros da família Strigeidae, como *C. lutzii* (BASCH, 1969), ou *Apatemon gracilis* (SMITH & HICKMAN, 1983), gêneros previamente relatados em anatídeos domésticos no país (TRAVASSOS *et al.*, 1969; COSTA *et al.*, 1986; FERNANDES *et al.*, 2015). O encontro de *B. straminea* infectado com formas larvais de *Cotylurus* sp. se deu exclusivamente nos pontos de coleta onde se concentravam os anseriformes domésticos (pontos de coleta A e B). Porém, novas abordagens, como amostragens de material fecal, com coleta ovos para obtenção de sequências moleculares poderão auxiliar na incriminação destas aves domésticas como os hospedeiros de *Cotylurus* sp. encontrado em moluscos da LCADM-MG. Já a identificação específica depende ainda da recuperação de parasitos adultos para estudo morfológico e molecular.

Dentre as larvas identificadas exclusivamente em moluscos, quatro tiveram estudos baseados na morfologia, sendo duas identificadas até o nível de família e duas em gênero: (1) Diplostomidae gen. sp. (2) *Drepanocephalus* sp. (3) *Renicola* sp. (4) Spirorchiiidae gen. sp. A identificação destas cercárias através do estudo morfológico foi possível devido ao conhecimento prévio sobre a ocorrência das mesmas na localidade

estudada (Belo Horizonte), bem como pela presença de caracteres morfológicos diferenciais. Entre estas, a cercária de Diplostomidae gen. sp. encontrada de *B. straminea* assemelha-se às larvas de *A. compactum*, principalmente devido a presença de fileiras de espinhos pré e pós-orais, glândulas de penetração pré-acetabulares e à observação de cinco pares de corpos caudais (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1982; PINTO & MELO, 2013a). Em Belo Horizonte, estudos experimentais e moleculares possibilitaram a identificação de larvas de *A. compactum* encontradas em *B. straminea* e em peixes (PINTO & MELO, 2013c; LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Apesar da similaridade morfológica, a ausência de informações experimentais e moleculares do parasito obtido na LCADM-MG nos impossibilita de identificar este estágio larval como *A. compactum*. A possibilidade de se tratar de outra espécie de Diplostomidae, como por exemplo, o gênero *Tylodelphys* (encontrada no presente estudo na forma larval metacercária) não pode ser descartada.

Em relação à cercária identificada como *Drepanocephalus* sp., sabe-se que esses trematódeos são parasitos intestinais de aves aquáticas com ampla distribuição pelo continente americano (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1968; KOSTADINOVA *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2016). O ciclo biológico necessita de dois hospedeiros intermediários, sendo o primeiro os moluscos e o segundo os peixes. No presente estudo, a larva encontrada se assemelha à duas outras estudadas por Pinto *et al.* (2016) provenientes da mesma localidade e do mesmo hospedeiro intermediário (*B. straminea*), mas pelo fato de ter sido realizado apenas uma comparação morfológica, não foi possível aprofundar-se na determinação taxonômica específica. No estudo de Pinto *et al.* (2016), ainda que se tenha realizado experimentações em vertebrados como peixes e aves na tentativa de elucidação do ciclo biológico, naquele momento foi possível obter apenas metacercárias. Todavia, na análise molecular utilizando-se os marcadores ribossômicos (28S, ITS) e mitocondriais (Nad-1), uma das formas larvais estudadas em 2016 pôde ser correlacionada a forma adulta de *Drepanocephalus auritus* recuperada de uma ave aquática da espécie *Phalacrocorax auritus*, proveniente da América do Norte (PINTO *et al.*, 2016). Novos estudos realizados no México revelaram a sinonímia entre *D. auritus* e *Drepanocephalus spathans* (HERNÁNDEZ-CRUZ *et al.*, 2018). Além disso, a outra larva encontrada no Brasil, identificada a época como *Drepanocephalus* sp., foi associada molecularmente a *Drepanocephalus mexicanus* (HERNÁNDEZ-CRUZ *et al.*, 2018). Estes resultados apontam para uma ampla distribuição dessas espécies no

continente americano, além da importância de estudos moleculares na conexão entre formas evolutivas.

Sabe-se que membros da família Spirorchiidae são parasitos presentes no sangue de quelônios (PLATT *et al.*, 2005 a; FERNANDES & KOHN, 2015), tendo como hospedeiros intermediários principalmente moluscos gastrópodes (GOODCHILD & KIRK, 1960; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). A infecção do hospedeiro definitivo se dá por penetração ativa das cercárias. No Brasil, seis espécies pertencentes a quatro gêneros já foram reportadas em tartarugas marinhas (FERNANDES & KOHN, 2015), o que nos traz uma lacuna quanto ao conhecimento das espécies relacionadas aos quelônios de água doce do país. O estudo destes parasitos no Brasil é incipiente, sendo o primeiro registro realizado apenas no ano de 2006, com o encontro de *Learedius learedi* em *Chelonia mydas* (WERNECK *et al.*, 2006), porém, sem dados moleculares. Quanto à fauna de água doce, surpreendentemente nenhuma espécie havia sido relatada em quelônios no Brasil até o ano de 2019, embora formas larvais já tenham sido relatadas infectando moluscos dulcícolas do gênero *Biomphalaria* e *Pomacea* sp., sendo a associação a esta família realizada por abordagem morfológica e molecular (PINTO *et al.*, 2015b). Ao comparar morfológicamente as três cercárias dessa família estudada por Pinto *et al.* (2015b), a cercária do presente estudo se assemelha aquela caracterizada por Spirorchiidae sp. 2 (recuperada de *B. glabrata*), principalmente pelo comprimento do corpo, da cauda e furcas. Salienta-se que, embora a cercária Spirorchiidae gen. sp. do presente estudo se assemelhe morfológicamente ao isolado identificado como Spirorchiidae sp. 2 encontrado em coleção dulcícola próxima, a hipótese de se tratar de uma espécie distinta não pode ser descartada. Recentemente, em estudo de espirorquídeos adultos recuperados de tartarugas do Rio Amazonas, levaram à descrição de um novo gênero e espécie (*Pitiutrema revelae*), sendo esta a primeira espécie da família identificada em nível específico no ambiente de água doce na América do Sul (DUTTON *et al.*, 2019), mas esta espécie difere molecularmente das três cercárias previamente reportadas no Brasil por Pinto *et al.* (2015b), o que reflete a necessidade de maior esforço amostral na obtenção de formas adultas e na perspectiva de associação com as formas larvais já encontradas.

Outro trematódeo verificado na LCADM-MG a partir de formas larvais, foi identificado como *Z. lunata*, espécie incluída na família Zygoctylidae Ward, 1917, que têm sido relatado em diferentes países do continente americano, desde à América do Sul, como Argentina (SUTTON & LUNASCHI, 1987), Chile (GONZÁLEZ-ACUÑA *et al.*,

2010) e Brasil (TRAVASSOS *et al.*, 1969; COSTA *et al.*, 1986; BARBOSA *et al.*, 2011), até à América do Norte como Canadá e EUA (FRIED *et al.*, 1998; FRIED *et al.*, 2009). Estes parasitos já foram reportados infectando aves como, por exemplo, anatídeos e galináceos, assim como mamíferos, dentre eles, ruminantes domésticos e cervídeos selvagens (WILLEY, 1941; COSTA *et al.*, 1986; FRIED *et al.*, 2009). O ciclo biológico envolve moluscos planorbídeos pertencentes aos gêneros *Helisoma* (*H. antrosa* e *H. anceps*) e *Biomphalaria* (*B. peregrina*, *B. tenagophila* e *B. straminea*) (WILLEY, 1941; ETGES, 1992; FRIED *et al.*, 2009) como hospedeiros intermediários naturais. No Brasil, a espécie foi previamente identificada em *B. straminea* também em Minas Gerais (BARBOSA *et al.*, 2011). Estudos que abordam o ciclo biológico de *Z. lunata* ao longo dos anos foram baseados em infecções experimentais, demonstrando então que este trematódeo pode ser mantido em condições laboratoriais (ETGES, 1992; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2003; FRIED *et al.*, 2009; OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2011), sendo este dado corroborado com os dados aqui apresentados. No presente estudo, o ciclo de vida do trematódeo pôde ser concluído em condições experimentais a partir do encontro de larvas do tipo Anfistoma emergias de *B. straminea*, sendo este o primeiro relato do trematódeo para Belo Horizonte. A prevalência observada nesta localidade (0,05%, 1/1.861- coletas regulares) foi inferior a verificada na mesma espécie de planorbídeo proveniente do município de Iguatama, Minas Gerais (0,53%, 14/2.609) (BARBOSA *et al.*, 2011).

A obtenção do trematódeo adulto a partir da infecção experimental em *Mus musculus*, possibilitou a identificação específica de *Z. lunata*, porém, ainda que não tenha sido possível a obtenção de espécimes adultos oriundos de hospedeiros definitivos naturalmente infectados, infere-se que esses sejam os anseriformes domésticos presentes na LCADM-MG, visto que um dos ovos de trematódeos identificados se assemelha morfolologicamente e morfometricamente àqueles descritos para *Z. lunata* (OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2011). Além disso, aves anatídeas já foram relatadas como hospedeiros definitivos de *Z. lunata* no país (COSTA *et al.*, 1986; FERNANDES *et al.*, 2015), o que reforça essa inferência. Entretanto, idealmente, poderia ser realizada a obtenção de ovos provenientes do material fecal destas aves para posterior obtenção de material genético destas amostras e comparação com as sequências obtidas da forma larval, mas esta etapa não pôde ser realizada até o momento. Não obstante, a observação do encontro do hospedeiro invertebrado (*B. straminea*) e possíveis hospedeiros definitivos (patos e marrecos), demonstra a manutenção do ciclo de vida do

agente parasitário no local, servindo de alerta para possível fonte de transmissão para outras espécies de animais ali presentes, tais como roedores e demais aves.

Ainda em relação a *Z. luneta*, com utilização da biologia molecular, foi possível obter as primeiras sequências genéticas para a espécie na América do Sul. A análise filogenética realizada a partir de sequências do marcador molecular 28S, demonstrou o agrupamento em um clado bem suportado entre *Z. lunata* e *W. zibethicus* (espécies que pertencem aos dois gêneros atualmente incluídos na família Zygotocylidae). Assim, os dados moleculares apresentaram concordância com a classificação baseada em caracteres morfológicos. Outro resultado importante foi obtido com a análise dos dados moleculares utilizando-se o marcador COI (região barcode), revelou 99,5% de similaridade com isolado da mesma espécie proveniente do Canadá (VAN STEENKISTE *et al.*, 2015), demonstrando uma coespecificidade entre estes isolados de *Z. lunata* no continente americano.

Para além dos trematódeos obtidos de planorbídeo, três espécies de trematódeos foram encontradas no tiarídeo *M. tuberculata* na LCADM-MG. Este molusco invasor possui origem asiática e africana (FACON *et al.*, 2003), sendo introduzido no Brasil na década de 1960 e, atualmente, apresenta ampla distribuição pelo país (FERNANDEZ *et al.*, 2003; COELHO *et al.*, 2019). Além disso, no Mundo, este molusco já foi incriminado na transmissão de 37 espécies de trematódeos, sendo a maioria dos registros ocorrentes no continente asiático (PINTO & MELO, 2011; PINTO *et al.*, 2018). Das espécies relatadas em *M. tuberculata*, onze apresentam reconhecido potencial zoonótico, causando doenças como a filoftalmose (LANG *et al.*, 1993; WAIKAGUL *et al.*, 2006), paragonimose (KEISER & UTZINGER, 2009), dermatite cercariana (SCHUSTER *et al.*, 2014), bem como o acometimento ocular causado pela penetração de cercárias (ARYA *et al.*, 2016). No Brasil, até o momento, cinco espécies de trematódeos foram encontradas infectando *M. tuberculata* (PINTO & MELO, 2012; PINTO & MELO, 2013; PINTO *et al.*, 2018; LOPES *et al.* 2019, 2020), sendo três delas (*Renicola* sp., *Centrocestus formosanus* e *Philophthalmus gralli*) identificadas na LCADM-MG durante o presente estudo.

É importante enfatizar que estes tiarídeos até então não haviam sido registrados na LCADM-MG. Em Belo Horizonte, a introdução de *M. tuberculata* foi verificada primeiramente na Lagoa da Pampulha na segunda metade da década de 1980 (CARVALHO, 1986; FREITAS & SANTOS, 1995) e atualmente permanece presente no local (PINTO, 2013). No presente estudo, essa espécie invasora representou o maior

número de exemplares coletados 68,3% (6.221/9.108) durante as coletas realizadas no período regular e posterior. Essa dominância de *M. tuberculata* na LCADM-MG pode ser justificada pela alta capacidade adaptativa e reprodutiva deste molusco a ambientes diversificados, desde a locais lânticos como lagos e lagoas e de pouca correnteza, além de córregos e riachos, sendo este molusco considerado resistente a agentes poluídos, estando bem adaptado às modificações antropogênicas (VASCONCELOS *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 1994; WEIR & SALICE, 2012). Em relação às infecções por trematódeos em *M. tuberculata* na LCADM-MG, chama atenção dois parasitos com potencial zoonótico e invasores estabelecidos na coleção dulcícola, com diagnóstico da infecção tanto no hospedeiro invertebrado, quanto em vertebrados (*P. gralli* e *C. formosanus*), o que demonstra um risco de transmissão à humanos e animais. Há de se referir que ambas espécies já foram relatadas em suas formas larvais na cidade de Belo Horizonte, na lagoa da Pampulha, assim como cercárias identificadas como pertencentes ao gênero *Renicola* (PINTO & MELO, 2010; PINTO & MELO, 2012; PINTO, 2013; PINTO & MELO, 2013).

No presente estudo, a cercária identificada como sendo do gênero *Renicola* sp. apresenta em seu ciclo de vida, moluscos prosobrânquios como primeiro hospedeiro intermediário, bivalves ou peixes como segundo hospedeiro, sendo as aves psívoras os hospedeiros definitivos, com encontro da forma adulta nos ureteres (PINTO E MELO, 2012; GIBSON *in* BRAY *et al.*, 2005; O'DWYER *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2016). No estudo de Pinto & Melo (2012a), foi obtido experimentalmente a metacercária, o que possibilitou realizar no presente estudo a comparação morfológica entre os isolados, sendo então possível identificar o gênero, tendo como principais características o comprimento da cauda equivalente ao corpo, sendo este espinhoso e presença vesícula excretora em forma de Y, este último, um fator de diagnose para a família, somada a outras características, como tipo de hospedeiro intermediário e distribuição geográfica. Atualmente, no Brasil já foram descritas três espécies desse gênero, sendo *R. cruzi* Wright, 1954, *R. mirandaribeiroi* Freitas, 1955 (FERNANDES *et al.*, 2015) e *R. sloanei* (MATOS *et al.*, 2019), sendo que nestas espécies citadas, a elucidação do ciclo biológico permanece incompleto. O gênero *Renicola* é ainda pouco explorado na taxonomia integrativa, principalmente em relação às formas adultas e a maior parte das sequências disponíveis para estes parasitos foram obtidas a partir de formas larvais (O'DWYER *et al.*, 2015). Para a América do Sul, as únicas sequências disponíveis são referentes a *R. sloanei*, cujo registro foi baseado no estudo de parasitos adultos encontrados em uma ave

marinha exótica (*Puffinus puffinus*) proveniente da costa do Paraná (MATOS *et al.*, 2019). Tendo em vista a reconhecida alta especificidade de trematódeos aos moluscos hospedeiros intermediários, assim como o parasito aqui identificado como *Renicola* sp. ter sido relatada no molusco invasor *M. tuberculata*, infere-se que espécies deste gênero de trematódeo sejam invasoras no país, o que demanda novos estudos. Dados moleculares preliminares obtidos de larvas semelhantes encontradas em *M. tuberculata* no Brasil, apesar de terem suportado a identificação do gênero, não permitiram avançar na identificação específica deste parasito (PINTO *et al.*, dados não publicados).

O estudo envolvendo o trematódeo *P. gralli* neste trabalho abrangeu primeiramente, o encontro do hospedeiro invertebrado *M. tuberculata* infectado naturalmente com larvas do tipo Megalura, com posterior coleta de metacercárias e infecção experimental de espécimes de *G. g. domesticus*. A partir de constatação do sucesso de infecção, foram realizados estudos visando o diagnóstico e tratamento da filoftalmose. Enfatiza-se, que a infecção do hospedeiro definitivo por *P. gralli* ocorre principalmente pela ingestão de metacercárias encistadas no ambiente, sendo a infecção por contato direto de cercárias também sugerida (ALICATA, 1962; NOLLEN & KANEV, 1995; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003), sendo que a ocorrência da espécie no Brasil se dá pela presença do molusco transmissor *M. tuberculata* (PINTO & MELO, 2010). Geralmente, infecções de aves por trematódeos do gênero *Philophthalmus* são relatadas como causas diretas e indiretas de danos ao complexo ocular podendo resultar em prejuízos à visão e conseqüentemente à saúde dos acometidos (ALICATA, 1962; NOLLEN & KANEV, 1995; MEISE & GARCIA-PARRA, 2015; HENEBERG *et al.*, 2017), sendo o diagnóstico da parasitose estando quase que estritamente associado ao encontro acidental dos parasitos conseqüente ao quadro clínico com distintos graus de acometimento da visão, assim como alterações sistêmicas secundárias, como anorexia e debilidade física nos hospedeiros (MUKARATIRWA *et al.*, 2005; ROJAS *et al.*, 2013; CHURCH *et al.*, 2013; MEISE & GARCIA-PARRA, 2015). Nesse sentido, o diagnóstico e tratamento da filoftalmose subclínica não são rotineiramente realizados, sendo a contribuição destes animais para a disseminação de ovos e manutenção dos focos de transmissão negligenciada.

No presente estudo, à princípio, o exame oftálmico e lavagem de saco conjuntival de frangos apresentando infecção experimental subclínica por *P. gralli* demonstraram-se eficazes para o diagnóstico e controle de cura desta parasitose. O encontro de ovos do parasito foi verificado mesmo em animais apresentando baixa carga parasitária, revelando

a sensibilidade do método de lavagem de saco conjuntival. Entretanto, quando a metodologia de LSC foi aplicada à campo, essa demonstrou-se ineficaz no diagnóstico de infecções naturais por *P. gralli* nos anatídeos em que o procedimento pôde ser realizado (*A. c. domesticus* e *C. m. domestica* - gansos e patos, respectivamente). Nesse aspecto, ainda que pelo EOD o diagnóstico do parasitismo tenha sido possível em 34% dos anseriformes (21/61), em apenas um ganso que apresentou carga parasitária acima de 5 no saco conjuntival, foi possível obter poucos ovos no exame de LSC, demonstrando assim, que o EOD permanece como ferramenta satisfatória no diagnóstico da filoftalmose. A diferença no resultado do exame de LSC nos estudos experimentais e a campo pode estar relacionada ao modo de vida destes animais, sendo que os frangos não possuem o hábito de imergirem a cabeça na água, o que possibilita o acúmulo de ovos do trematódeo no saco conjuntival, distinto dos anseriformes da LCADM-MG, que passam a maior parte do dia em contato com a água.

Quanto ao tratamento, ainda que a retirada mecânica seja uma técnica na maioria das vezes eficaz em debelar a infecção, há casos em que devido a elevada carga parasitária, apenas a remoção dos parasitos não demonstrou ser totalmente eficaz para a resolução da infecção (GREVE & HARRISON, 1980; ROJAS, 2013; CHUNCH 2013; HENEBERG *et al.*, 2017). Além disso, os procedimentos relacionados a remoção mecânica podem ser considerados complexos e de difícil realização em algumas circunstâncias, demandando atenção e experiência no reconhecimento de estruturas parasitárias. Dessa forma, tratamento farmacológico se apresenta como uma opção necessária e promissora. Contudo, são escassos os estudos avaliando a abordagem farmacoterapêutica na filoftalmose. Os poucos estudos existentes revelaram a eficácia de drogas como a aplicação tópica de creolina (NOLLEN & MURRAY, 1978) e carbamatos (GREVE & HARRISON, 1980), sendo metodologias inaceitáveis e ultrapassadas na atualidade. Além disso, a atividade parcial do levamisol (1,5 mg/kg/vo) no tratamento da filoftalmose em avestruzes (*Struthio camelus*) foi demonstrado por Mukaratirwa e colaboradores (2005).

Entre as drogas amplamente utilizadas no tratamento de infecções por platemintos, incluindo trematódeos, que infectam humanos e animais encontram-se o praziquantel, com mecanismo de ação ainda não totalmente conhecido (MULLER *et al.*, 1993; DAYAN, 2003; CHAI, 2013a). Na maioria dos casos, doses entre 10-40 mg/kg têm se demonstrado eficazes no tratamento de infecções caudadas por trematódeos, tanto em mamíferos quanto em aves (MARTINS *et al.*, 2003; CHAI, 2013a). No presente estudo,

a avaliação do praziquantel como única abordagem para o tratamento da filoftalmose aviária foi realizada pela primeira vez. Os resultados obtidos demonstram a ineficácia deste fármaco, nas doses e esquemas terapêuticos avaliados, no tratamento de frangos infectados por *P. gralli*. Estes resultados também foram verificados por Church *et al.* (2013) durante o tratamento em emas (*Rhea americana*) infectadas naturalmente por *P. gralli*. Neste estudo, a remoção mecânica dos parasitos associada à restrição das aves à coleção d'água contaminada e ao uso de pomada a base de praziquantel 1% duas vezes ao dia, demonstraram eficácia variável na eliminação dos parasitos, sendo que, o tempo de cura (avaliado pelo exame oftálmico e presença de sinais clínicos) foi de até 15 semanas. Nesse sentido, o praziquantel administrado por via tópica (pomada a 1%) em avestruzes (CHUNCH *et al.*, 2013) ou intramuscular (10, 50 e 100mg/kg) em frangos (presente estudo) não apresenta resultados satisfatórios na eliminação do parasito.

Em outro estudo, Rojas *et al.* (2013) durante o tratamento da infecção por *P. gralli* em *Tinamus major* na Costa Rica, utilizaram a associação de quatro bases anti-helmínticas nas seguintes posologias: ivermectina 1% 0,2mg/kg intramuscular, pirantel 20mg, febendazol 50mg e praziquantel 5 mg por via oral administrados em solução durante cinco dias consecutivos e após sete dias da última dosagem o protocolo terapêutico foi repetido. Após duas semanas, parasitos foram visualizados durante um novo exame oftálmico, o que foi interpretado pelos autores como reinfecção. Entretanto, diante da ausência de informações sobre o controle de cura, a possibilidade de se tratar da falha terapêutica não pode ser descartada, especialmente considerando-se que um tempo superior a 14 dias é necessário para o crescimento, e possivelmente, para a visualização macroscópica dos mesmos na conjuntiva dos animais, visto que a migração de *P. gralli* para seu micro-habitat no hospedeiro vertebrado decorre por volta de nove dias após a infecção no saco conjuntival e quatorze dias para a membrana nictitante em frangos, sendo que, nesse período, os espécimes medem aproximadamente de 1,20 a 1,80 mm, valores três a duas vezes menores se comparados aos parasitos com 30 dias de infecção (média de 2,80 mm), respectivamente (ISMAIL & ISSA, 1987; NOLLEN, 1993). Além disso, o mesmo protocolo utilizado por Rojas *et al.* (2013) pôde ser novamente empregado na infecção por *P. lacrymosus* em gaivotas (*Larus michahellis* e *Larus fuscus*) e, como resultado, não houve sucesso terapêutico avaliado pelo exame oftálmico, com posterior remoção mecânica dos espécimes realizada diariamente (HENEBERG *et al.*, 2018), o que demonstra uma variabilidade na resposta do parasitismo

por *P. gralli* ao tratamento com as bases anti-helmínticas, assim como ocorreu no estudo experimental aqui apresentado.

O uso de febendazol (50 mg/Kg por via oral fornecida em 3 dias consecutivos) não levou a resultado satisfatório na terapêutica da filoftalmose em frangos tratados no presente estudo. Este fármaco é um amplamente utilizado no tratamento de aves infectadas por diferentes grupos de helmintos (LAWRENCE, 1983; KIRSCH, 1984; YAZWINSKI *et al.*, 1992). O febendazol encontra-se entre as bases utilizadas no tratamento da filoftalmose em *T. major* por Rojas *et al.* (2013), mas a eficácia do tratamento realizado foi inconclusiva. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem uma atividade parcial deste fármaco com *P. gralli*. Entretanto, devido aos protocolos terapêuticos utilizados na infecção experimental não terem apresentado eficácia satisfatória, nas intervenções à campo na LCADM-MG, decidiu-se por não realizar tentativas de tratamento nos anatídeos ali presentes. Assim, como em outros estudos, a retirada mecânica dos parasitos foi a abordagem que possibilitou a resolução total da infecção nas aves infectadas experimentalmente por *P. gralli*, assim como nos anatídeos naturalmente infectados na LCADM-MG. É importante salientar que em animais de vida livre, essa torna-se uma ação momentânea e que não impede reinfecções, visto que no local foram encontrados espécimes de *M. tuberculata* infectados naturalmente, o que comprova a manutenção do ciclo biológico do parasito no local.

Apesar dos relatos de caso de infecção de anatídeos silvestres e avestruzes criados em cativeiro infectados por *P. gralli* no Brasil (MUNIZ-PEREIRA & AMATO, 1993; VEROCAI *et al.*, 2009), ainda há pouco conhecimento sobre a epizootia da filoftalmose, tanto no país quanto em outros continentes. Ressalta-se, que a prevalência de infecção por este parasito em *M. tuberculata* foi de 1,61% (73/4.545) no presente estudo, sendo esta superior àquela encontrada por Pinto (2013) na Lagoa da Pampulha (0,17%, 19/11.468). Provavelmente a concentração de aves infectadas em um pequeno local pode ter favorecido este resultado. Nos animais de vida livre, as prevalências variaram entre 25 e 37% entre os anseriformes domésticos, sendo estes com infecção subclínica, visto que na literatura atual, as publicações relacionadas à infecção por *P. gralli* geralmente se referem ao encontro acidental em hospedeiros com algum grau de lesão ocular (VEROCAI *et al.*, 2009; ROJAS *et al.*, 2013).

Não obstante, neste mesmo lago urbano, além da infecção em anseriformes, houve o encontro de uma ave silvestre de comportamento semi-aquático migratório com um número expressivo de parasitos recuperados (total de 147 espécimes) no mesmo ambiente

de vivência dos anseriformes. Neste aspecto, é importante mencionar que estudos apontam a manutenção do foco de transmissão de *P. gralli* pelo hospedeiro invertebrado, mesmo após dois anos da retirada de hospedeiros definitivos infectados (ROJAS *et al.*, 2013; HENEBERG *et al.*, 2014), o que demonstra a dificuldade no controle da filoftalmose em determinado ambiente e, devido a isto, alerta para o risco de infecção acidental em outros animais, como os mamíferos, incluindo os seres humanos que frequentam o local, como também o alerta para a dispersão do parasito para novas localidades, assim como a infecção de aves nativas.

Em relação aos aspectos morfológicos e moleculares de *P. gralli*, pôde-se notar diferenças no tamanho dos espécimes recuperados, sendo maiores aqueles pertencentes a *A. c. domesticus* e *G. g. domesticus* (obtido experimentalmente) se comparados aqueles provenientes de *C. m. domestica* e *G. galeata*. Contudo, as características morfológicas consultadas na literatura (ALICATA, 1962; NOLLEN & KANEV, 1995), assim como a similaridade das sequências genéticas comprovam ser referentes a mesma espécie os exemplares obtidos dos distintos hospedeiros avaliados. Por outro lado, na análise filogenética com o marcador Nad-1, é interessante mencionar primeiramente o particionamento das três espécies de *Philophthalmus* com sequências disponíveis (*P. gralli*, *P. lachrymosus* e *P. lucipetus*). Já no clado com os haplótipos representados por *P. gralli*, as sequências obtidas dos anseriformes domésticos e de *M. tuberculata* agruparam-se com outros haplótipos oriundas da Costa Rica. Entretanto, o haplótipo obtido de *G. galeata*, além de apresentar maior valor de similaridade (99,9%) com uma sequência de *P. gralli* dos EUA ao comparar com os demais da LCADM-MG, também se agrupou separadamente com o haplótipo norte americano. Esses dados demonstram uma ampla distribuição de *P. gralli* por todo continente e possivelmente múltiplos eventos de introdução.

No estudo malacológico, embora *B. straminea* e *M. tuberculata* tenham sido as espécies mais abundantes, outras três espécies de gastrópodes foram também encontradas: *P. columella*, *Physa acuta* e *Pomacea* sp. Ressalta-se, que moluscos gastrópodes do gênero *Physa*, também possuem uma variedade de larvas de trematódeos já relatadas na literatura, como, por exemplo, *E. revolutum* (Lutz, 1924); *E. luisreyi* (MALDONADO-JUNIOR *et al.*, 2003), mas no presente estudo, em nenhum molusco deste gênero pôde ser observado larvas de trematódeos. No estudo realizado numa localidade próxima, na Represa da Pampulha, foram encontradas duas espécies de fisídeos (*P. marmorata* e *P. acuta*), sendo possível obter larvas identificadas apenas na

primeira, posteriormente identificada como pertencentes à espécie *E. exile*, sendo a prevalência de 2,01% (4/199) (PINTO, 2013). Já com relação ao ampulário *Pomacea* sp., este gênero já havia sido reportado na LCADM-MG no estudo de Freitas & Santos (1995), à época identificados como *Pomacea haustrum*, nome também utilizado para a espécie relatada desde 1940 na Lagoa da Pampulha (MILWARD-DE-ANDRADE, 1959; FREITAS & SANTOS, 1995). Todavia, as características biológicas de *Pomacea* sp. encontradas em Belo Horizonte, em especial a coloração das desovas (rosas), difere do conhecido para *P. haustrum* (desovas de cor verde), sendo esta última espécie com distribuição amazônica. Este provável equívoco de identificação foi previamente discutido por PINTO (2013). Estudos morfológicos e moleculares sugerem que se trata de uma nova espécie endêmica da região sudeste (S.C. Thiengo e M. A. Fernandes, comunicação pessoal). Em relação ao ambiente, a observação de espécimes de moluscos do gênero *Pomacea* e *B. straminea* na LCADM-MG, muito provavelmente está associada à presença de vegetação, presente principalmente nos pontos de coleta C e A, respectivamente, locais onde foram encontrados maior número de *B. straminea* durante o período regular de coleta, sendo essa característica ambiental associada à presença desses moluscos também reportada por Freitas e Santos (1995) em coleção dulcícola na cidade de Lagoa Santa. Quanto às formas larvais de trematódeos obtidas de *Pomacea* sp. da LCADM-MG, foi possível observar emergência de cercárias do tipo Xifidiocercária (prevalência de 1,54%, 1/65), sendo que o mesmo tipo cercariano também foi anteriormente relatado nesta espécie de molusco na lagoa da Pampulha, com prevalência de 0,28% (2/717) (PINTO, 2013a).

Na LCADM-MG, durante as coletas malacológicas foram avaliadas quatro espécies de peixes e constatada a infecção por trematódeos em sua forma metacercária em três delas, sendo então esses peixes considerados o segundo hospedeiro intermediário no ciclo biológico destes trematódeos. Dentre as espécies de peixes infectadas, há 31 exemplares de *Australoheros* sp., conhecidos popularmente como cará, acará, cará camaleão, acará camaleão. Seu nome popular advém da língua Tupi e significa “*aquele que morde*”. Esse ciclídeo apresenta ampla distribuição pela América do Sul, com atualmente 20 espécies válidas (OTTONI & KATZ, 2017). Sua coloração varia desde o castanho claro, amarelo a esverdeado, com faixas escuras longitudinais e manchas, o que lhe confere excelente capacidade de camuflagem nos *habitats* em que vive: em meio a plantas aquáticas de rios, lagoas, córregos e remansos, geralmente em áreas de fluxo lântico e locais onde podem construir ninhos, como rochas (LATINI & PETRERE, 2004; ŘÍČAN *et al.*, 2011;

OTTONI, 2013; OTTONI & KATZ, 2017), sendo essas características ambientais, também presentes no local do seu encontro no estudo aqui apresentado. Além disso, este peixe apresenta hábito alimentar onívoro, generalista e oportunista, com ingestão de moluscos, insetos artrópodes, ovos e larvas de insetos, restos de peixes, algas e sedimento, respectivamente (ŘÍČAN *et al.*, 2011; OTTONI & KATZ 2017).

Do ponto de vista parasitológico, algumas características chamam atenção em relação à infecção por *Clinostomum* sp. em *Australoheros* sp. provenientes da LCADM-MG. A primeira delas é a prevalência por este trematódeo (74,19% - 23/31), o que demonstra que esses peixes estão fortemente associados a microhabitats com a presença de moluscos transmissores. Como característica dessas metacercárias, foi observada a formação de encapsulamentos extratecuiduais, maleáveis, assemelhando-se a saculações exclusivamente em estruturas localizadas na cabeça, como opérculo, base das brânquias e seios cranianos, respectivamente, distinto de outros relatos já encontrados na literatura, em que as metacercárias tinham como sítio de infecção comumente a cavidade corporal, musculatura e membranas de nadadeiras (EIRAS *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2001; VIANNA *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2015a; KHAN *et al.*, 2018). Outra peculiaridade, é que, embora o encontro de *Australoheros* sp. infectados por *Clinostomum* sp. tenha sido comum na LCADM-MG, os peixes estavam restritos a somente dois pontos de coleta malacológica (ponto A e D). De fato, esses locais apresentam características ideais para o *habitat* desses vertebrados, como pedras e vegetação. Entretanto, esses mesmos pontos tiveram pouca recuperação de moluscos planorbídeos (*B. straminea*) e, na avaliação das formas larvais, não foram identificadas em nenhum momento cercárias do tipo Brevifurcada que indicassem características inferentes ao gênero *Clinostomum* sp., como já relatado em *B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila* provenientes da lagoa da Pampulha (PINTO, 2013). Além disso, ainda na lagoa da Pampulha, à época, foram recuperadas metacercárias em peixes e também formas adultas identificadas como *C. heluans* e *C. marginatum* na ave aquática *Butorides striata* (PINTO, 2013; PINTO *et al.*, 2015a), o que indica uma diversidade de espécies e até mesmo infecção cruzada em um mesmo hospedeiro definitivo. Nos estudos mencionados, também é interessante observar que a espécie *B. straminea* teve uma prevalência muito baixa por cercárias referentes ao gênero (0,006%, 1/16.235) (PINTO, 2013; PINTO *et al.*, 2015a). Essas características, junto à ausência do encontro de cercárias no presente estudo, leva a inferir sobre uma baixa susceptibilidade do hospedeiro invertebrado à infecção por larvas de *Clinostomum* sp., mas estudos aprofundados necessitam ser realizados para esta averiguação.

Sabe-se que trematódeos clinostomídeos apresentam distribuição cosmopolita, com grande diversidade de espécies descritas (KANEV *et al.*, 2002; FERNANDES *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2015a; ROSSER, *et al.*, 2016; CAFFARA *et al.*, 2017), embora haja lacunas quanto à elucidação de ciclos biológicos. Isto se dá pela complexidade do ciclo do trematódeo, que envolve dois hospedeiros intermediários, tendo hospedeiro definitivo as aves piscívoras (KANEV *et al.*, 2002; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). No Brasil, já foram relatadas quatro espécies do gênero *Clinostomum*, sendo: *C. complanatum* (Rudolphi, 1809); *C. detruncatum* Braun, 1899; *C. heluans* Braun, 1899) e *C. marginatum* (Rudolphi, 1819) (TRAVASSOS *et al.*, 1969; FERNANDES *et al.*, 2015). Destas, após estudos morfológicos e moleculares, há o consenso de que a espécie *C. complanatum* não ocorre em continente americano, estando restrita ao Velho Mundo (CAFFARA *et al.*, 2011). Na LCADM-MG, a forma infectante recuperada de espécimes de *Australoheros* sp. foi identificada como *Clinostomum* sp. primeiramente por não ser uma forma adulta que possibilite uma classificação específica neste primeiro momento, mas também pelo fato do espécime do presente estudo se diferir das demais espécies já relatadas no país (TRAVASSOS *et al.*, 1969; FERNANDES *et al.*, 2015). Dentre as características de diferenciação, há de se atentar pela localização do primórdio genital, sendo na metacercária de *C. heluans* mais posterior (PINTO, 2013); enquanto que metacercárias da espécie *C. marginatum* provenientes da América do Norte diferenciam-se pela posição da abertura poro genital, ao qual, na espécie citada, a estrutura localiza-se estritamente na linha anterior do testículo anterior (CAFFARA *et al.*, 2011) e no espécime aqui apresentado o poro genital tem sua abertura na linha média ou posterior do testículo anterior. Em relação à espécie *C. dendrucatum*, na comparação com o espécime adulto (TRAVASSOS *et al.*, 1969) e metacercária (ACOSTA *et al.*, 2016), os órgãos reprodutivos assim como o primórdio genital, respectivamente, se encontram na metade final da região posterior na espécie citada, enquanto o isolado descrito no presente trabalho, o primórdio genital localiza-se na metade anterior da região posterior. Além disso, na metacercária de *C. dendrucatum*, o saco do cirro e o poro genital encontram-se sob a borda anterior do testículo anterior (ACOSTA *et al.*, 2016), diferindo-se da espécie estudada no presente estudo.

Atualmente, publicações envolvendo a validação e sinonimização de espécies de *Clinostomum* têm empregado metodologias de comparação morfológica e molecular na diferenciação de espécies. Dentre eles, estão abordagens com foco na forma e posicionamento do complexo genital, com referência à estabilidade destas estruturas em

metacercárias e adultos, servindo como caracteres comparativos (CAFFARA *et al.*, 2011; CAFFARA *et al.*, 2017; SERENO-URIBE *et al.*, 2018). De fato, com o aumento das pesquisas em associação de estudos morfológicos e moleculares, muitas questões têm sido solucionadas, como a separação da ocorrência de *C. marginatum* restrita ao Novo Mundo e *C. complanatum* ao Velho Mundo (CAFFARA *et al.*, 2011). Além disso, no continente americano, principalmente na América Central, nos últimos anos têm havido um avanço considerável em relação à descrição de novas espécies para o gênero *Clinostomum*. Isso se deu, devido a um grande esforço amostral em coletas à campo de peixes com obtenção de metacercárias (LOCKE *et al.*, 2014; PÉREZ-PONCE DE LÉON *et al.*, 2016) e posteriormente o mesmo ocorrendo com aves, com associações entre formas imaturas e adultas em decorrência de análise morfológica e molecular (SERENO-URIBE *et al.*, 2018).

Neste contexto, observamos uma grande diversidade de espécies do gênero em apenas uma restrita faixa do continente americano, o que nos leva a questionar sobre uma complexidade ainda maior quanto à taxonomia de *Clinostomum*. Essa indagação se dá, primeiramente, pelo fato da espécie tipo de *C. marginatum* ser proveniente do Brasil, constando apenas os dados morfológicos realizados à época (TRAVASSOS *et al.*, 1969). Até o momento, não há estudos moleculares comparativos entre isolados nacionais de *C. marginatum* com sequências provenientes da América do Norte, permanecendo assim, o questionamento se essa espécie apresenta distribuição por todo o continente, ou se referem-se a espécies distintas, atualmente identificadas como *C. marginatum* nestas regiões. Em relação à biologia molecular, com utilização de marcadores ribossomais foi possível particionar de forma efetiva os distintos gêneros da família Clinostomidae na análise de comparação pareada, assim como na filogenia. O marcador mitocondrial COI ofereceu boas informações sobre diferenciação entre espécies pertencentes ao continente americano, tendo maior proximidade com isolados provenientes do México em comparação com outras regiões. Todavia, nas divergências interespecíficas, o haplótipo do presente estudo apresentou menor divergência (COI: 3,27-3,71%) com a espécie mexicana *C. cichlidorum*, porém, na comparação morfológica, ainda que características como posição do primórdio genital assemelham-se entre ambas as espécies, o tegumento da metacercária apresentada no presente estudo apresenta espinhos a partir da linha posterior da ventosa ventral se acentuando até o terço posterior do corpo, enquanto em *C. cichlidorum* o tegumento é liso. Dessa forma, infere-se que o isolado aqui relatado pode

tratar-se de uma nova espécie, mas uma análise morfológica comparativa, assim como novos esforços amostrais, principalmente em aves aquáticas devem ser implementados.

Outro peixe encontrado albergando metacercárias de trematódeos foi identificada como sendo da espécie *H. malabaricus*. Como breve descrição da biologia deste vertebrado, sabe-se que sua ocorrência se dá em praticamente todas as bacias hidrográficas da América do Sul (BARBIERI, 1989; LIMA *et al.*, 2017), sendo seu *habitat* preferencialmente ligado às coleções de água com fluxo lântico, como lagoas e remansos, mas também podem ser encontradas em rios maiores, apresentando capacidade de adaptação em distintos ambientes e mudanças nos mesmos (BARBIERI, 1989; LATINI & PETRINI, 2004; LIMA *et al.*, 2017). Esses peixes possuem hábito alimentar estritamente carnívoro nos adultos, enquanto os filhotes ingerem conforme se desenvolvem desde plânctons a invertebrados, como insetos aquáticos e moluscos, respectivamente (BARBIERE, 1989; LATINI & PETRINI, 2004; CORRÊA & PIEDRAS, 2009). Embora este peixe tenha sido encontrado albergando metacercárias de diplostomídeo, no presente estudo é impossível inferir sobre alterações do comportamento em um único espécime de *H. malabaricus* de vida livre infectado, mas estudos já publicados elucidam que trematódeos diplostomídeos como aqueles que infectam olhos e cavidade craniana de peixes, podem modificar o comportamento e visão desses vertebrados, o que leva a uma menor agilidade nas fugas e, conseqüentemente à maior chance de predação por aves aquáticas (infecção do hospedeiro definitivo) e concretização do ciclo biológico parasitário (SHIRAKASHI & GOATER, 2005; SEPPÄLÄ *et al.*, 2004; MIKHEEV *et al.*, 2010). Além disso, a infecção por diplostomídeos pode acarretar debilidade, retardo no crescimento e emagrecimento no peixe infectado por ter sua procura por alimentos (presas) prejudicada tanto no aspecto da visão, quanto da locomoção (SZIDAT, 1969).

A metacercária recuperada de *H. malabaricus* foi identificada morfológicamente como pertencente ao gênero *Tyloodelphys* sp., principalmente devido à presença de pseudosulcos laterais à ventosa oral, assim como presença de ventosa ventral no início da porção posterior e órgão tribocítico desenvolvido presente no terço posterior (GÁRCIA-VARELA *et al.*, 2016; BLASCO-COSTA *et al.*, 2017; CHAUDHARY *et al.*, 2017). Esses diplostomídeos possuem uma ampla diversidade de espécies, sendo três espécies na sua forma adulta reportadas em aves piscívoras no Brasil: *T. americana* (Dubois, 1936); *T. adulta* Lunaschi & Drago, 2004 e *T. elongata* (Lutz, 1928) (FERNANDES *et al.*, 2015). Já as metacercárias são comumente relatadas infectando peixes em várias

localidades do mundo, tendo como sítio de infecção os olhos, cavidade craniana e bexiga natatória (WEIBLEN & BRANDÃO, 1992; FLORES & SEMENAS, 2002; CHIBWANA *et al.*, 2013; LOCKE *et al.*, 2014; GÁRCIA-VARELA *et al.*, 2016; BLASCO-COSTA *et al.*, 2017; CHAUDHARY *et al.*, 2017). Ressalta-se que a infecção de *H. malabaricus* por espécies *Tylodelphys* foi previamente reportada no Brasil (WEIBLEN & BRANDÃO, 1992; PELEGRINI *et al.*, 2019).

Com a utilização do marcador 28S, constatou-se que o haplótipo do presente estudo teve maior proximidade com duas cercárias obtidas do planorbídeo *B. havanensis* provenientes da América do Norte (99,5% de similaridade; Diplostomidae gen. sp. 1, Genbank: KT728779; KT728774), sendo que com o marcador ITS, os valores de similaridade entre sequências obtidas na comparação com esses mesmos haplótipos foi de 98,7%, o que demonstra que essas cercárias pertencem ao gênero *Tylodelphys*. Em relação ao estudo filogenético com o marcador ITS, o espécime aqui apresentado se relaciona mais estritamente com haplótipos do gênero oriundos do México e EUA se comparado às sequências provenientes do Velho Mundo. Entretanto, o haplótipo do presente estudo permaneceu isolado das demais sequências do continente americano, assim como apresentado por García-Varela *et al.* (2016) com o mesmo marcador, em que foi possível observar a relação estrita entre haplótipos da mesma espécie. Não obstante, no estudo de Pelegrini *et al.* (2019), também foi utilizada análise molecular, mas com o marcador mitocondrial COI, o que impossibilitou a comparação a nível genético com o isolado da LCADM-MG. Quanto à morfologia, além da diferença morfométrica (sendo a ventosa ventral e órgão tribocítico menores no espécime aqui estudado), na publicação citada de Pelegrini *et al.* (2019), há menção da ausência dos pseudosulcos nas formas infectantes, sendo esta estrutura visível no isolado encontrado na LCADM-MG, sugerindo tratar-se de espécies distintas.

Amplamente distribuída pela América do Sul e Central, a espécie de peixe *Poecilia reticulata*, popularmente denominada como lebiste ou barrigudinho, tem grande adaptação a distintas coleções dulcícolas, como lagoas, córregos, rios, remansos e também a águas poluídas e, entre aquaristas, sua criação ornamental é considerada a mais comum (ARAÚJO *et al.*, 2007; MONTAG *et al.*, 2011). Possuem hábito alimentar quase que exclusivamente baseado na ingestão de larvas e detritos de insetos aquáticos, sendo então considerados larvívoros e, devido a essa característica, são utilizados como agentes de controle de larvas de mosquitos, como por exemplo, larvas de *Aedes aegypti* (SENG *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2014). Em relação à LCADM-MG esta espécie de peixe é

extremamente comum no local, tendo sido encontrada diversas vezes junto à rede de coleta malacológica em todos os pontos, mas devido à sua cor prateada, esses espécimes eram facilmente visualizados e devolvidos à coleção. Ainda assim, alguns exemplares não eram vistos e chegavam ao laboratório junto ao material para triagem, estando a maioria degradados, por isso, a informação sobre o número exato não foi estipulada. Além disso, ao observar os anseriformes, percebeu-se que essas aves passavam boa parte do tempo na água predando esses animais e outros que por ventura, estivessem principalmente, próximos às margens, assim como os moluscos.

Do ponto de vista parasitológico, puderam ser identificados dois tipos de trematódeos em espécimes de *P. reticulata*, sendo o primeiro identificado como *Centrocestus formosanus* na forma larval metacercária, tendo como característica a formação de cistos muito aderidos aos filamentos branquiais. Embora espécimes deste parasito já tenham sido relatados infectando humanos no continente asiático, consequente à ingestão de hospedeiros intermediários, como peixes malcozidos (o que inclui as brânquias) (CHAI *et al.*, 2013), as infecções por *C. formosanus* estão mais correlacionadas ao potencial para causar prejuízos à piscicultura, pois as cercárias ao realizarem encistamento nos filamentos branquiais dos peixes, induzem ao processo inflamatório e perda do epitélio respiratório, comprometendo a troca gasosa nestes vertebrados (MITCHELL *et al.*, 2000), acarretando atraso no desenvolvimento e morte por asfixia (MITCHELL *et al.*, 2005; ARGUEDAS-CORTÉS *et al.*, 2010). No Brasil, devido a um surto de infecção desse trematódeo em peixes ornamentais *Xiphophorus maculatus* (Actinopterygii: Poeciliidae), foi relatada a mortalidade de aproximadamente 95% do cardume (LEIBOWITZ *et al.*, 2019), o que nos traz um alerta sobre o risco para a saúde de peixes nativos do país principalmente em alevinos.

Também em *P. reticulata* pôde ser recuperado um único espécime de *Apharyngostrigea* sp., na forma larval de metacercária, localizado na cavidade corpórea de um único peixe, tendo como característica do trematódeo a formação de um cisto livre. Ressalta-se que trematódeos desse gênero já foram descritos anteriormente infectando naturalmente *P. reticulata* no reservatório da Lagoa da Pampulha (PINTO & MELO, 2012b). Além disso, as medidas morfométricas obtidas de *Apharyngostrigea* sp. do presente estudo se aproximam de dois tipos de metacercárias encistadas do gênero *Apharyngostrigea* sp. recuperadas da mesma espécie hospedeira, descritas por Pinto (2013) e pouco maior que metacercárias encistadas de *A. simplex* recuperadas de *Cnesterodon decemmaculatus*, na Argentina (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1989). Além

disso, em outros estudos, dados moleculares recentemente obtidos de cercárias de *Apharyngostrigea* encontradas em *Biomphalaria* de coleções aquáticas da região metropolitana de Belo Horizonte, associado a informações obtidas de formas adultas encontradas em aves de diferentes países (Argentina, Canadá), possibilitaram a identificação de *A. simplex* e *A. pipientis* (LÓPEZ HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Devido à distribuição geográfica dos isolados identificados acima, assim como do hospedeiro invertebrado transmissor, infere-se ser possível que a metacercária aqui reportada pertença a uma destas espécies.

Já em relação aos hospedeiros definitivos obtidos na LCADM-MG, pôde-se, além dos anseriformes domésticos como já citado, realizar a avaliação *post mortem* de um espécime *G. galeata*, o qual foi encontrado infectado por três espécies de trematódeos (*Echinostoma* sp., *C. mutabile* e *P. gralli*). Como nota sobre a biologia desses ralídeos, sabe-se que a espécie *Gallinula galeata* (= *G. chloropus*) possui ampla distribuição pelas Américas, de hábito aquático (FREDRICKSON, 1971; OLSON, 1973), onívoro, alimentando-se de vegetais, invertebrados como moluscos, insetos e pequenos vertebrados, respectivamente (FREDRICKSON, 1971; LAIMANOVICH & BELTZER, 1993; OLGUÍN *et al.*, 2013). Também possui comportamento territorialista e grande adaptabilidade a novos ambientes (FREDRICKSON, 1971). Nas coleções aquáticas, como lagoas, esses ralídeos possuem predileção a localizarem-se próximos às margens com vegetação, onde selecionam seus alimentos, fazem ninhos e possuem esconderijos, aventurando-se raramente em locais abertos (HEIMSATH *et al.*, 1993). O frango d'água é considerado uma ave migratória, mas, na maioria das vezes, seus voos se limitam a serem rápidos e furtivos num espaço restrito para novos locais de forrageamento e fuga e raramente percorrem distâncias consideráveis tendo seu ambiente propício, exceto quando motivadas a colonizarem novas áreas, como por exemplo, os machos jovens subordinados (LIVEZEY, 2003). Na LCADM-MG, essas aves foram vistas em várias ocasiões próximos aos anseriformes domésticos, coletando plantas aquáticas e invertebrados próximas à margem, além dos alimentos colocados no local. É interessante mencionar que, mesmo sendo um espécime juvenil, o que pode ser evidenciado pela coloração acinzentada (FREDRICKSON, 1971; OLSON, 1973), o animal necropsiado apresentou três espécies de trematódeos em forma adulta. Destes, *P. gralli* foi recuperado em número expressivo (147 exemplares), até mesmo comparado aos anseriformes domésticos que vivem na mesma área (19 exemplares de *P. gralli* em um ganso). Do ponto de vista parasitológico, o comportamento de *G. galeata* (territorialista a migratório)

pode ser importante para a manutenção de trematódeos em uma determinada área e também para a dispersão a novas coleções aquáticas. Para que o espécime tenha se infectado por tais degeneos, em relação aos dois primeiros trematódeos, esta ave obrigatoriamente ingeriu algum molusco infectado no local e em relação a *P. gralli*, há possibilidade de infecção tanto por cercárias quanto por metacercárias, sendo esta última encistada em substratos, como conchas de moluscos e vegetais.

Por ser comum no território nacional e pelo seu hábito aquático, uma diversidade de trematódeos já foi documentada em *G. galeata* no Brasil, composta por espécies pertencentes às famílias Echinostomatidae Poche, 1926 (10 espécies), Strigeidae (2 espécies), Cyclocoelidae Kossack, 1911 (1 espécie), Leucochloridiidae Poche, 1907 (1 espécie), Notocotylidae Lühe, 1909 (1 espécie) e Dicrocoeliidae Looss, 1899 (1 espécie) (FERNANDES *et al.*, 2015). No presente estudo, um equinostomatídeo identificado como *Echinostoma* sp. foi recuperado do intestino do ralídeo. Sabe-se que trematódeos deste gênero tem em seu ciclo biológico a presença de dois hospedeiros intermediários, sendo o primeiro obrigatoriamente um molusco e o segundo podendo ser um invertebrado (outro molusco) ou vertebrado (peixes ou anfíbios) (GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003; KOSTADINOVA *in* JONES *et al.*, 2005; TKACH *et al.*, 2015). No Brasil, já foram relatadas até o momento, vinte e duas espécies do gênero *Echinostoma* (FERNANDES *et al.*, 2015). Dessas, sete espécies já foram documentadas infectando ralídeos da espécie *G. galeata* (FERNANDES *et al.*, 2015), sendo: *E. aphylectum* Dietz, 1909; *E. erraticum* Lutz, 1924; *E. microrchis* Lutz, 1924; *E. necopinum* Dietz, 1909; *E. neglectum* Lutz, 1924; *E. nephrocystis* Lutz, 1924 e *E. revolutum* (Froelich, 1802) Looss, 1899. Os espécimes recuperados de *G. galeata* na LCADM MG, apresentaram perdas de espinhos do colar peristômico, o que impediu uma análise morfológica aprofundada, visto que o número e a disposição dessas estruturas são imprescindíveis para uma classificação taxonômica baseada na morfologia (KANEV *et al.*, 2009; KOSTADINOVA *in* JONES *et al.*, 2005 b). Além disso, diante da impossibilidade de uma comparação morfológica efetiva, ao ser realizado o estudo molecular, observou-se ausência de similaridades em relação às demais sequências de haplótipos depositados no *GenBank*, não sendo possível obter resultados que sustentem uma identificação específica. Contudo, observou-se que o haplótipo do presente estudo se agrupou com demais membros do complexo *revolutum*, ou seja, aqueles que morfológicamente apresentam 37 espinhos (GEORGIEVA *et al.*, 2013; GEORGIEVA *et al.*, 2014).

No presente estudo dois trematódeos pertencentes à família Cyclocoelidae Stossich, 1902 foram identificados: *C. mutabile*, encontrado em *G. galeata* e *T. cucumerinum* em *A. p. domesticus* e *C. m. domestica*. Em relação a *C. mutabile*, sabe-se que este trematódeo apresenta vasta distribuição geográfica, com relatos no continente americano, europeu e asiático (TRAVASSOS *et al.*, 1969; MCLAUGHLIN, 1976; MCLAUGHLIN, 1986; LUNASCHI *et al.*, 2007; DRONEN & BLEND, 2015; SITKO *et al.*, 2017; LÓPEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2018b). No Brasil, têm-se registrada apenas *C. mutabile* (TRAVASSOS *et al.*, 1969; FERNANDES *et al.*, 2015; DRONEN & BLEND 2015). Em relação à morfologia, essa espécie pode ser diferenciada das outras do gênero devido à ausência de ventosa oral, posição da vitelária e abertura do poro genital (DRONEN & BLEND, 2015; SITKO *et al.*, 2017; LÓPEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2018b). Nos espécimes avaliados no presente trabalho, pôde-se notar aumento da coloração próxima a abertura oral, inferindo ser um tecido diferenciado, o que leva ao questionamento da presença de uma ventosa oral rudimentar ou uma boca, assim como observado em alguns espécimes de ciclocoelídeos redescritos por López-Jiménez *et al.* (2018b). Entretanto, apenas uma avaliação histológica poderia trazer com exatidão essa diferenciação tecidual, o que não foi viável no momento.

Embora no presente estudo não tenha sido possível a determinação de transmissão do parasito na localidade, com ausência de formas larvais indicativas de *C. mutabile* nos moluscos, é interessante salientar que em estudos experimentais anteriores envolvendo o ciclo biológico do trematódeo, foi possível a observação de formas imaturas intramoluscos em limneídeos (*Stagnicola elodes* = *L. elodes*), fisídeos (*P. gyrina*) e planorbídeos (*H. trivolvis*, *Promenetus exacuous*, *Gyraulus circumstriatus* e *Armiger crista*), inclusive com encontro de metacercárias em todas as espécies e conclusão do ciclo biológico experimental (MCLAUGHLIN, 1976; MCLAUGHLIN, 1986). Dessa forma, novos esforços amostrais fazem-se necessários para a identificação dos moluscos transmissores deste parasito no Brasil.

Quanto à biologia molecular, em relação ao marcador ribossomal 28S, na comparação pareada, as divergências entre membros da família Cyclocoelidae ficaram entre 4% e pouco mais que 7% e entre outras famílias as divergências foram entre 7,45% (*Moliniella anceps*, GenBank KT956921) a 9,61% (*P. gralli*, Genbank JQ246435), demonstrando pouca diferenciação entre espécies da superfamília Echinostomatoidea com este marcador, mas na filogenia o particionamento entre membros das distintas famílias foi bem suportado. Chama a atenção um haplótipo identificado como *C. mutabile*

proveniente da Escócia reportado por Olson *et al.* (2003) em que, na comparação pareada, obteve-se divergência de 7,10%, maior do que comparado aos haplótipos de outros gêneros como *Morishitium polonicum* (4,07%; Genbank LC520231), *Typhlocoelum* spp. da América do Norte e do presente estudo (4,07%; Genbank KT956960 e 4,41%, respectivamente) e de *Tracheophylus cymbius* (4,24%, Genbank MK327367). Na análise filogenética, o haplótipo descrito como sendo *C. mutabile* da Escócia, não agrupou-se com o haplótipo do presente estudo, mas sim com *Neohaematotrepheus arayae* proveniente do México, indicando que este isolado escocês de *C. mutabile* possa ser pertencente a outra espécie. Já com o marcador mitocondrial Nad-1, as sequências de isolados de *C. mutabile* provenientes do Peru (GOMEZ-PUERTA *et al.*, 2018) e da República Tcheca (GALOSI *et al.*, 2019) divergiram em 0,27% (Genbank MH091808-10, sequências sul-americanas), 3,34 e 3,62% (Genbank KU877891/ KX097823, sequências européias), respectivamente, suportando a coespecificidade com o novo isolado brasileiro.

Já nos anseriformes domésticos, foi obtido anteriormente durante necropsia na Escola de Veterinária da UFMG, um trematódeo proveniente da traqueia, posteriormente identificado como *T. cucumerium*. Este trematódeo apresenta em seu ciclo biológico a presença de um molusco gastrópode como hospedeiro intermediário, onde as rédias produzem cercárias e metacercárias que permanecem intramolusco, não existindo uma fase larval livre, exceto pelo miracídio (SCHAFRANSKI, 1974; SCOTT *et al.*, 1982; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003). Neste caso, o hospedeiro definitivo infecta-se ao ingerir o molusco contendo formas infectantes e o parasito adulto se desenvolve na traqueia de anatídeos. Este trematódeo apresenta ampla distribuição geográfica, com relatos desde à Europa, até o continente americano (SCOTT *et al.*, 1982; TKACH *et al.*, 2016) e no Brasil, a infecção por *T. cucumerinum* em aves já foi reportada em algumas regiões como Distrito Federal, Maranhão, Minas Gerais e no Rio de Janeiro (COSTA *et al.*, 1986). Na década de 1970, Schafranski realizou o estudo biológico baseado em procedimentos experimentais com invertebrados e hospedeiros definitivos, fornecendo importantes informações, mas o ciclo de vida do parasito não havia sido elucidado completamente, visto que o encontro do hospedeiro invertebrado infectado naturalmente não foi reportado, até então. Entretanto, com o uso de estudos morfológicos e moleculares, no presente estudo foi possível associar formas larvais encontradas no molusco *B. straminea* às formas adultas provenientes dos anseriformes domésticos, em parte pela recuperação do trematódeo em uma das aves e também pelo encontro de ovos

típicos de *T. cucumerinum* observados no exame parasitológico de fezes. Dessa forma, com a abordagem da taxonomia integrativa, houve a demonstração da manutenção do parasito na localidade e a elucidação do ciclo biológico anteriormente irresoluto.

Dados moleculares relacionados ao gênero *Typhlocoelum* são praticamente ausentes, existindo apenas uma sequência com o marcador 28S de um isolado identificado como *Typhlocoelum* sp. proveniente dos EUA. Na comparação pareada, este isolado apresentou divergência de 0,69% em relação ao haplótipo de *T. cucumerinum* do presente estudo. Curiosamente, ainda nesta análise, o isolado de *T. cucumerinum* aqui apresentado, foi mais próximo de *Tracheophilus cymbius* da China (divergência de 0,18%). Em relação a estas três sequências, na análise filogenética foi observado o particionamento entre o haplótipo do presente estudo, como uma linhagem isolada, sendo as duas sequências do hemisfério norte presentes no mesmo clado, ainda que de gêneros diferentes (valores de suporte 0,92 IB/ 92 MV). Esses dados sugerem fortemente que o isolado de *T. cymbius* pertence ao mesmo gênero das espécies de *Typhlocoelum*. Novos estudos integrativos com estes parasitos são necessários afim de se esclarecer se o gênero *Tracheophilus* é realmente válido. Ressalta-se, que a separação morfológica entre esses dois gêneros se baseou na presença ou ausência da ventosa ventral pouco desenvolvida, diferenças quanto a lobulação do testículo (acentuada em *Typhlocoelum*), na posição do poro genital (faringeal ou pós faringeal em *Typhlocoelum* e pré-faringeal em *Tracheophilus*), além da terminação dos folículos vitelínicos (inconfluentes em *Typhlocoelum* e confluentes em *Tracheophilus*) (KANEV *et al.* in GIBSON *et al.*, 2005).

Em relação a *T. cucumerinum* obtido no presente estudo, todas as características de diagnose para o gênero *Typhlocoelum* foram observadas (KANEV *et al.* in GIBSON *et al.*, 2005), exceto pela ausência na visualização da ventosa ventral rudimentar, mas há dúvidas se houve impedimento devido à coloração de tecidos sobrepostos, em especial do útero repleto de ovos, ou se esta estrutura realmente é ausente, o que vai em desacordo com a ilustração da espécie tipo (ver pág.157, KANEV *et al.* in GIBSON *et al.*, 2005). Entretanto, no estudo de Travassos (1921) com isolados do Brasil, não há menção à presença de ventosa ventral no espécime descrito e ilustrado (TRAVASSOS *et al.*, 1969), fato também reportado por Schafranski (1974), o que implica na necessidade de uma revisão morfológica criteriosa para a espécie, assim como na utilização de ferramentas como a microscopia eletrônica, que poderá evidenciar o tegumento e as particularidades ali presentes. Já em relação ao isolado tido como pertencente a *T. cymbius* proveniente da China, este se restringiu à deposição da sequência do DNA ribossomal no *Genbank*, o

que impossibilitou a comparação morfológica. Ademais, tanto *Typhlocoelum* quanto *Tracheophilus* apresentam distribuição cosmopolita e infectam os mesmos tipos de hospedeiros (KANEV *et al.* in GIBSON *et al.*, 2005), o que serve de alerta para uma identificação taxonômica mais criteriosa na diferenciação dessas espécies.

Hydrochoerus hydrochaeris foi o único mamífero proveniente da LCADM-MG estudado quanto aos aspectos parasitológicos, sendo dois os espécimes encontrados avaliados *post mortem*. Como breve histórico sobre a biologia do hospedeiro, a capivara, na língua Tupi “*kapii'gwara*” (comedor de grama), é considerada o maior roedor encontrado no planeta, herbívoro, de hábito semi-aquático, com ampla distribuição pela América do Sul (AZCÁRATE, 1980; ALHO *et al.*, 1987; MOREIRA & PINHEIRO, 2013). Porém, até a década de 1960, devido à caça excessiva e descontrolada, a população de capivaras em alguns países como o Brasil chegou a quase extinção, o que levou a criação de políticas protetivas (MOREIRA & PINHEIRO, 2013) e, como consequência, houve um reestabelecimento da população desses animais que tem alta capacidade reprodutiva e formam extensos grupos sociais, sendo bem adaptados ao *habitat* onde vivem, podendo ser encontrados em regiões rurais, urbanizadas e em criações para produção de carne e estimação (AZCÁRATE, 1980; ALHO *et al.*, 1987; VERDADE & FERRAZ, 2006; MOREIRA E PINHEIRO, 2013). Além disso, as capivaras são hospedeiras de uma diversidade considerável de parasitos, dentre eles, dez espécies de trematódeos (BOERO & BOEHRINGER, 1967; CASAS *et al.*, 1995; COSTA & CATTO, 1994; BONUTI *et al.*, 2002; SANTARÉM *et al.*, 2006) e desses, até o momento apenas *F. hepatica* possui o ciclo de vida elucidado.

Embora haja muitos estudos sobre a biologia das capivaras em meio natural, pouco se conhece sobre o seu comportamento e dinâmica populacional em relação aos ambientes urbanos, ainda que sejam extremamente comuns em muitas cidades, inclusive grandes metrópoles como São Paulo e Belo Horizonte (LABRUNA *et al.*, 2017). Em relação às capivaras que vivem na LCADM-MG, enfatiza-se que estas estão presentes na localidade possivelmente desde antes a criação do conjunto arquitetônico governamental, visto que a região abrange muitas fontes de água, como nascentes, lagoas e córregos, além do Parque Estadual Serra Verde. Á princípio, antes mesmo das intervenções junto aos anseriformes domésticos, os funcionários da CADM-MG discorriam sobre o enorme grupo de capivaras rotineiramente vistos no local, sendo quantificados certa vez a quantidade aproximada de 60 indivíduos, entre filhotes, jovens e adultos. Esses roedores são atraídos para a área muito provavelmente devido às condições favoráveis à

alimentação, visto que o local possui além da lagoa e trecho de mata, extenso gramado, onde puderam em várias ocasiões serem observadas marcas da passagem desses animais pelo local durante as coletas malacológicas. Do ponto de vista parasitológico, sabe-se que o ciclo de vida dos três trematódeos recuperados das capivaras (*F. hepatica*, *H. hippocrepis* e *Tachorxis* sp.) se dá, basicamente pela presença de moluscos gastrópodes aquáticos susceptíveis, pela contaminação de formas infectantes encistadas em substratos como vegetais e, por fim, pela ingestão passiva das metacercárias na vegetação pelo hospedeiro vertebrado (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1976; SOULSBY, 1982; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003), sendo que esses trematódeos já foram relatados em outros trabalhos infectando este hospedeiro em distintas regiões (CASAS *et al.*, 1995; BONUTI *et al.*, 2002; SANTARÉM *et al.*, 2006).

Em relação à espécie *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, sabe-se que este platelminto apresenta distribuição cosmopolita, sendo considerada uma antropozoonose negligenciada (WHO, 2013; MAS-COMA *et al.*, 2018). No Brasil, a expansão da fasciolose se deu historicamente a partir da região Sul, dispersando posteriormente para as regiões Sudeste e Centro-Oeste (UENO *et al.*, 1982; AMATO *et al.*, 1986; SERRA-FREIRE & NUERNBERG, 1992; LIMA *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2014; MEDEIROS *et al.*, 2014; BENNEMA *et al.*, 2017), sendo a manutenção do seu ciclo de vida dependente da presença do hospedeiro invertebrado limneídeo (MEDEIROS *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2014), já tendo sido relatados casos em seres humanos no país (IGREJA *et al.*, 2004; PRITSCH & MOLENTO, 2018). Não obstante, é sabido que este trematódeo apresenta grande importância em relação aos prejuízos à pecuária (SPITHILL *et al.*, 1997; SCHWEIZER *et al.*, 2005; BENNEMA *et al.*, 2017), sendo bem reportada a participação dos ruminantes domésticos como principais hospedeiros e da importância dos mesmos correlacionada à fasciolose humana (MAS-COMA *et al.*, 2009; BENNEMA *et al.*, 2014; PRITSCH & MOLENTO, 2018). Entretanto, ressalta-se que na literatura há algumas décadas já tem sido abordada a presença de animais silvestres ou introduzidos infectados por *F. hepatica* na América do Sul, como, por exemplo, lebres europeias (*Lepus europaeus*) no Chile (CUERVO *et al.*, 2015; OYARZÚN-RUIZ *et al.*, 2019), rato d'água (*Myocastor coypus*) no Uruguai (GAYO *et al.*, 2011) e camelídeos, como as alpacas andinas (*Lama pacus*) no Peru (PUENTE, 1997). No Brasil, em relação aos animais silvestres, já foram relatadas infecções por *F. hepatica* em capivaras no estado de São Paulo (SANTARÉM *et al.*, 2006; LABRUNA *et al.*, 2018), Paraná (EL-KOUBA *et al.*, 2008) e Minas Gerais (DRACZ *et al.*, 2016), além da infecção em emas (*Rhea*

americana) de cativeiro e vida livre no estado do Rio Grande do Sul (SOARES *et al.*, 2007). Ademais, em região próxima à capital mineira, já foi realizado anteriormente o registro da infecção por *F. hepatica* em bovinos, bubalinos e capivaras provenientes da zona rural dos municípios de Pedro Leopoldo, São José da Lapa e Confins, região subjacente à CADM-MG (DRACZ *et al.*, 2016). No presente estudo, encontra-se o primeiro registro de fasciolose para a cidade de Belo Horizonte, o que demonstra a expansão do parasito antes restrito às regiões rurais, para centros urbanos no Estado. Quanto aos moluscos hospedeiros de *F. hepatica* na LCADM-MG, enfatiza-se que durante o estudo malacológico foram coletados 39 espécimes de *P. columella* e, mesmo que não tenha sido observada a emergência de cercárias do tipo Gimnocéfala, o registro de capivaras infectadas, como também do molusco considerado como principal transmissor do helminto na região Sudeste, alerta para um potencial foco de transmissão de *F. hepatica* na região e, como já dito, a presença de animais, assim como do hospedeiro invertebrado transmissor, tem forte correlação com casos humanos de fasciolose (BUSETTI, 1982; BENNEMA *et al.*, 2014).

Na análise morfológica, observou-se nos espécimes de *F. hepatica*, uma diferenciação entre estágios de maturidade, sendo encontrados desde exemplares imaturos com menos de 2 mm a outros já desenvolvidos com mais de 30 mm, o que infere que a área da CADM-MG seja um foco de infecção e reinfecções para o trematódeo, mesma característica relatada por Labruna *et al.* (2018) no parque ecológico localizado na cidade de São Paulo. Além disso, os autores do trabalho citado relatam a ocorrência de alta mortalidade nas capivaras infectadas, visto que primeiramente, eram observados até 21 espécimes de todas as faixas etárias desses roedores e, ao final de 1,5 anos de observação do grupo, os trabalhos foram interrompidos devido à mortalidade de 90% dos indivíduos, tendo como *causa mortis* a fasciolose, característica que parece se assemelhar as observadas no presente estudo. Na LCADM MG, no período de 2 anos foram relatados por trabalhadores locais o encontro de outros nove indivíduos mortos na localidade, além de dois espécimes já em estado de decomposição observados dentro e à beira do corpo d'água, o que aponta para a necessidade de pesquisas para a susceptibilidade, mortalidade e letalidade de *H. hydrochaeris* nas infecções por *F. hepatica*. Já na análise molecular com o marcador Nad-1 pôde-se obter a confirmação de que os haplótipos da LCADM-MG são coespecíficos às amostras da Polônia, Armênia e Irã relatados em bisão e bovinos domésticos, o que demonstra mais uma vez uma grande diversidade de haplótipos de *F. hepatica* no Brasil (LABRUNA *et al.*, 2018; SCHWANTES *et al.*, 2019).

Dentre os membros da família Notocotyloidea Lühe, 1909, três gêneros já foram descritos na América do Sul: *Catatropis* Odhner, 1905; *Notocotylus* Diesing, 1839 e *Hippocrepis* Travassos, 1922 (TRAVASSOS *et al.*, 1969; FERNANDES *et al.*, 2015). O gênero *Hippocrepis* Travassos, 1922 tem como a espécie tipo *Hippocrepis hippocrepis* (Diesing, 1850), sendo a única relatada em capivaras, além das espécies *H. fuelleborni* e *H. myocastoris* descritas infectando ratão do banhado (*Myocastor coypus*) (BARTON & BLAIR, 2005; FERNANDES *et al.*, 2015). Embora sejam vastos os relatos de encontro de *H. hippocrepis* infectando capivaras na América do Sul, inclusive no Brasil (TRAVASSOS, 1922; KOHN & PEREIRA, 1970; FERNANDES *et al.*, 2015; BONUTI *et al.*, 2002; SINKOC *et al.*, 2009), a elucidação do ciclo biológico deste trematódeo permaneceu irresoluta até o presente estudo.

Em relação aos aspectos malacológicos, na Lagoa da Pampulha já havia sido relatado o encontro de cercárias com as mesmas características do tipo Monostoma em *B. straminea*, contudo, com prevalência inferior (0,42%, 68/16.235) (PINTO, 2013) àquela relatada no presente estudo (12,30%, 229/1.861 - coletas regulares). Além disso, ainda que no trabalho presente não tenham sido relatadas outras espécies de *Biomphalaria* com infecção por larvas do tipo Monostoma, no estudo de Pinto (2013) foram descritas três espécies (*B. straminea*, *B. glabrata* e *B. tenagophila*), com relato da infecção apenas na primeira, o que infere a especificidade do trematódeo por esta espécie de molusco. Nas fases imaturas, larvas do tipo Monostoma são formadas por representantes da superfamília Notocotyloidea. Na América do Sul, poucos estudos sobre o ciclo biológico destes parasitos foram realizados de forma completa, como *H. fuelleborni* (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1976) e *Notocotylus biomphalariae* n. sp. (FLORES & BRUGNI, 2005), estando restritos como relatos de encontro das formas imaturas em moluscos ou do encontro de parasitos adultos nos hospedeiros definitivos (TRAVASSOS, 1922; KOHN & PEREIRA, 1970; SUTTON *et al.*, 1997; FLORES *et al.*, 2007).

Quanto à forma adulta de *H. hippocrepis*, pôde-se constatar que os espécimes aqui analisados apresentam medidas próximas aquelas relatadas por demais autores (KOHN & PEREIRA, 1970; SUTTON *et al.*, 1997). Em relação à diferenciação de infecções causadas por trematódeos do gênero *Hippocrepis*, essa é possível tanto em hospedeiros *post mortem* pelo encontro do parasito adulto e análise morfológica, quanto em animais *in vivo* pelo exame de material fecal e aspecto dos ovos (KOHN & PEREIRA, 1970; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1976; SUTTON *et al.*, 1997; FLORES *et al.*, 2007), em que *H. hippocrepis* possui um filamento em cada região polar dos ovos (KOHN & PEREIRA,

1970), *H. fuelleborni* não possui estrutura filamentosa (OSTROWSKI DE NUÑEZ, 1976) e *H. myocastoris* possui dois pares de filamentos em sua única região polar (FLORES *et al.*, 2007). Neste trabalho, o comprimento dos filamentos se diferenciou consideravelmente na mesma espécie daquele apresentado por Kohn & Pereira (1970) e por Flores *et al.* (2007) em *H. myocastoris*. Kohn & Pereira (1970) não mencionam a forma como esses ovos foram obtidos (do meio intrauterino ou por material fecal) e no trabalho de Flores *et al.* (2007) há a informação de retirada de ovos maduros na porção final do útero, o que nos leva a duas hipóteses: a primeira que ao obter as medidas de ovos retirados diretamente do útero, há grande risco de rompimento dos filamentos enovelados no local e a segunda pela não visualização da progressão desses filamentos em microscópio, que se afinam progressivamente, ficando difícil sua visualização completa em muitos exemplares e/ou predispondo a rompimentos. No presente estudo também foi possível o acréscimo de característica em relação ao tegumento já observada por Sutton *et al.* (1997), com presença de estruturas semelhantes a pequenas papilas com aspecto espinhoso, mais desenvolvidas na porção anterior que decrescem gradualmente conforme vão em direção posterior.

No estudo molecular com o marcador ribossomal 28S foi possível obter 100% de similaridade entre as cercárias do tipo *Monostoma* coletadas tanto na LCADM-MG e na Lagoa da Pampulha, como também à forma adulta recuperada do hospedeiro vertebrado, sendo observado na topologia da árvore filogenética o agrupamento desses haplótipos em comparação a outros notocotilídeos, o que demonstra uma excelente diferenciação entre haplótipos de distintos gêneros para esta família. Na comparação pareada, o mesmo resultado pôde ser obtido para o marcador mitocondrial COI, o que possibilitou devido à associação entre estudos morfológicos e à biologia molecular, a elucidação pela primeira vez do ciclo de *H. hippocrepis*. Este é o primeiro estudo realizado na América do Sul e segundo já descrito posterior à utilização de metodologias clássicas e moleculares, com elucidação do ciclo biológico de trematódeos da família Notocotyliidae, já tendo sido realizado anteriormente para a espécie *Notocotylus atlanticus* com amostras europeias e russas, porém, com uso de marcadores exclusivamente ribossomais (28S e ITS-1) (GONCHAR *et al.*, 2019).

O trematódeo identificado como *Taxorchis* sp. foi recuperado de um dos espécimes de *H. hydrochaeris* na LCADM-MG, sendo este helminto pertencente à família Cladorchiidae Fiscoeder, 1901 (JONES *in* JONES *et al.*, 2005 b). Os parasitos deste gênero ocorrem na América do Sul, já tendo sido descritas cinco espécies: *T. cabrali*

(Sinkoc, Müller & Brum, 1998); *T. caviae* Kawazoe, Cordeiro & Artigas, 1981; *T. massaroi* (Paulsen, Müller, Brum & Sinckoc, 1999); *T. ringueleti* Sutton, 1975 e *T. schistocotyle* Fiscoeder, 1901. Destas, *T. cabrali* e *T. schistocotyle* foram relatadas em *H. hydrochaeris* no Brasil (FERNANDES *et al.*, 2015), sendo a primeira espécie com registros de infecção na região sul e sudeste do país (São Paulo) (SINKOC *et al.*, 1998; SINKOC *et al.*, 2004; SINKOC *et al.*, 2009) e *T. schistocotyle* considerada uma espécie com ampla distribuição, com relatos na Argentina (SUTTON, 1989), Bolívia (CASAS *et al.*, 1995), Panamá (FAUST, 1935), Venezuela (SALAS & HERRERA, 2004) e diferentes regiões do Brasil (SINKOC *et al.*, 2009), (TRAVASSOS *et al.*, 1969; COSTA & CATTO, 1994; BONUTI *et al.*, 2002; SINKOC *et al.*, 2004). A infecção em *H. hydrochaeris* por *T. schistocotyle* foi previamente registrada na localidade de estudo (Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte) (AVELAR *et al.*, 2015).

Morfológicamente, *T. schistocotyle* e *T. cabrali* se diferenciam principalmente pela posição das vitelárias, sendo de posição extracecais em *T. schistocotyle*, cecais e intracecais confluentes em *T. cabrali*, assim como comprimento dos cecos (em *T. cabrali* há o contorno da zona pré acetabular) e disposição da musculatura acetabular (SINKOC *et al.*, 1998). Além dessas características, pessoalmente, ao observar as figuras das duas espécies, percebe-se que as ramificações testiculares de *T. schistocotyle* são menores em relação ao tamanho do corpo sem contato entre si, já em *T. cabrali* este órgão reprodutivo aparenta ter maiores ramificações e chegam a manter contato na linha longitudinal do corpo. Já o espécime do presente estudo, ainda que tenha sido possível a recuperação de um exemplar adulto, este não se encontrava plenamente desenvolvido, não sendo possível uma delimitação clara da vitelária, o que impossibilitou uma identificação taxonômica específica. Ademais, ainda que tenha sido utilizada marcadores moleculares ribossomal (ITS-2) e mitocondrial (COI região pós-barcode), até o momento, estas são as únicas sequências produzidas para o gênero. No geral, embora trematódeos do gênero *Taxorchis* pertençam à família Cladorchiidae, as árvores filogenéticas obtidas sugerem que molecularmente esse haplótipo se distingue dos outros cladorquídeos recuperados de peixes e anfíbios e com sequências disponíveis para comparação (HASEGAWA *et al.*, 2013; PANTOJA *et al.*, 2019). Dessa forma, o estudo aqui apresentado sobre *Taxorchis* sp. demonstra algumas limitações presentes na taxonomia integrativa, tendo sido encontradas dificuldades na análise morfológica pela presença de apenas um trematódeo adulto, porém pouco desenvolvido e pela inexistência de sequências do gênero para comparação a nível molecular.

Como observações finais, o presente estudo contribui para o conhecimento da biologia de trematódeos digenéticos ocorrentes em um lago urbano no Brasil, com demonstração de uma grande diversidade de parasitos em um espaço restrito, assim como da elucidação de ciclos biológicos e contribuição para o conhecimento de epizootias. Na abordagem taxonômica, ainda que várias metodologias tenham sido praticadas, algumas dificuldades permanecem irresolutas. Dentre elas, tem-se a impossibilidade de descrição específica de formas larvais quando da ausência da associação experimental ou molecular com sua forma adulta, assim como impedimentos no encontro de materiais bibliográficos com descrição morfológica dos trematódeos reportados, visto que muitos artigos fazem referência à helmintofauna de hospedeiros, mas sem discorrer sobre a morfologia e biologia dos trematódeos neles recuperados.

Embora o Brasil seja um país com extensão territorial continental, onde ocorrem vários biomas e uma das mais ricas biodiversidades do planeta, sendo assim, também de hospedeiros e parasitos, há de abordar a falta de incentivo em pesquisas taxonômicas em território nacional, estando muitos dos estudos atuais vinculados a parcerias com instituições de pesquisa e agências de fomento estrangeiras. Além disso, a falta de recursos e fomentos para a taxonomia gera desconhecimento e desvalorização do profissional, assim como no desinteresse na formação e qualificação dos mesmos, sendo este um importante entrave para o conhecimento em biodiversidade (PEARSON *et al.*, 2011; BIK, 2017). De fato, novos esforços amostrais devem ser empregados em relação à fauna, como pesquisas malacológicas e de vertebrados através de convênios com projetos multidisciplinares em instituições de ensino e pesquisa, clínicas veterinárias de animais silvestres e Centros de Triagem de Animais Silvestres (CETAS-ICMBio).

Em relação aos estudos moleculares, embora o desenvolvimento de marcadores ribossomais e mitocondriais seja um considerável avanço na taxonomia de trematódeos e cada vez mais utilizados, gerando conhecimento em estudos de evoluções, distribuição geográfica, ecologia e associações entre formas evolutivas, há de se enfatizar algumas limitações. Dentre elas, a escassez de sequências para comparação provenientes da América do Sul, reflexo da falta de pesquisa em taxonomia integrativa com abordagem molecular na região, assim como deposição da maioria das sequências referentes às formas larvais, o que remete mais uma vez à necessidade de esforço amostral quanto aos vertebrados. No geral, ressalta-se que bases genéticas não possuem a verdade absoluta e apresentam falhas que devem ser observadas criteriosamente, tais como: (1) deposição de sequências referentes a espécie de trematódeo não identificada corretamente; (2)

deposição de sequências sem publicações vinculadas, o que dificulta a análise e comparação de dados; (3) deposição de sequências referentes à publicação de trabalhos exclusivamente moleculares, impossibilitando análise morfológica; (4) falta de informação no banco de dados genéticos e/ou nos trabalhos publicados, como hospedeiro e localidade; (5) discordância entre informações presentes para determinada sequência no banco de dados genético em relação à publicação vinculada e; (6) à incongruência entre validação morfológica na determinação de entidades taxonômicas em relação à análises moleculares.

Como perspectivas futuras, há na taxonomia integrativa de trematódeos, a necessidade de um contínuo esforço amostral, assim como o monitoramento de mudanças no habitat estudado ao longo do tempo, o que pode vir a alterar a relação parasito x hospedeiro ali estabelecida. No mais, em relação às formas larvais, sabe-se que em quase a totalidade das vezes sua descrição específica depende da obtenção de informações advindas da forma adulta, seja decorrente de infecções experimentais em vertebrados (estando cada vez mais restritas e muitas vezes inconclusivas) ou pela associação a partir de estudos moleculares, gerando dependência de amostragem de hospedeiros vertebrados de vida livre e posterior deposição de sequências (o que se passa por restrições na captura e amostragem de fauna nativa e livre para determinados fins). Diante disso, é cada vez mais iminente a necessidade de desenvolvimento e aprimoramento de outras ferramentas no estudo da biologia de trematódeos. Dentre elas, há o exemplo do cultivo de formas larvais de trematódeos *in vitro* com a obtenção de parasitos adultos (VOGE & JEONG, 1971; FRIED & STABLEFORD, 1991; BLASCO-COSTA *et al.*, 2019).

Por fim, a taxonomia integrativa tem possibilitado um avanço no conhecimento da biodiversidade no Brasil, assim como das interações parasito e hospedeiro. É sabido que muito se tem a desenvolver e capacitar taxonomistas no país, não somente para o conhecimento científico, mas para o conhecimento da sanidade do ambiente e das populações que convivem em contato direto ou indireto com esses platelmintos, como estes interagem com os hospedeiros e o ambiente, assim como possíveis mudanças ao longo do tempo e seus impactos.

7. CONCLUSÕES

O estudo taxonômico integrativo de trematódeos encontrados em moluscos e vertebrados encontrados na Lagoa da Cidade Administrativa do Estado de Minas Gerais (LCADM-MG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, possibilitou a elucidação de novos aspectos biológicos e filogenéticos relacionados aos helmintos, sendo várias destas interações biológicas identificadas pela primeira vez no país. Desta forma, foi possível obter as seguintes conclusões:

1. Na LCADM-MG, ocorrem atualmente pelo menos cinco espécies de moluscos gastrópodes: *Biomphalaria straminea*, *Melanoides tuberculata*, *Physa acuta*, *Pseudosuccinea columella* e *Pomacea* sp.
2. Pelo menos 20 espécies de trematódeos digenéticos ocorrem na LCADM-MG.
3. *Biomphalaria straminea* atua como hospedeiro intermediário de Crassiphialinae gen. sp., *Cotylurus* sp., Diplostomidae gen. sp., *Drepanocephalus* sp., *Hippocrepis hippocrepis*, *Hysteromorpha* sp., Spirorchiidae gen. sp., *Typhlocoelum cucumerinum* e *Zygocotyle lunata* na localidade.
4. *Melanoides tuberculata* é o hospedeiro intermediário de *Philophthalmus gralli*, *Centrocestus formosanus* e *Renicola* sp. na LCADM-MG.
5. *Pomacea* sp. é o hospedeiro intermediário de uma espécie de trematódeo não identificada caracterizada por formas larvais (cercárias) do tipo Xifidiocercária.
6. O ciclo biológico de *Hippocrepis hippocrepis* possui *B. straminea* como primeiro hospedeiro intermediário.
7. *Biomphalaria straminea* atua como primeiro hospedeiro intermediário natural de *Typhlocoelum cucumerinum*.
8. *Fasciola hepatica* ocorre em capivaras da LCADM-MG, sendo este o primeiro registro do agente antroponótico para Belo Horizonte.
9. O ciclo de vida de *Philophthalmus gralli* é mantido na LCADM-MG, envolvendo aves domésticas e silvestres como hospedeiros definitivos e o *Melanoides tuberculata* como hospedeiro intermediário.
10. *Zygocotyle lunata* apresenta ampla distribuição pelo continente americano e os estudos filogenéticos suportam a sua inclusão na família Zygocotylidae.
11. Os dados moleculares suportam a identificação morfológica de *Cyclocoelum mutabile*, espécie que ocorre na América do Sul e Europa.

12. Os registros de *Clinostomum* sp., *Tylodelphys* sp. e *Echinostoma* sp. revelam dificuldades para a identificação específica embasada em dados moleculares, tendo em vista a escassez de sequências referência.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA AA, CAFFARA M, FIORAVANTI ML, UTSUNOMIA R, ZAGO AC, FRANCESCHINI D, SILVA RJ (2016). Morphological and molecular characterization of *Clinostomum detruncatum* (Trematoda: Clinostomidae) metacercariae infecting *Synbranchus marmoratus*. *Journal of Parasitology*, 102 (1): 151–156.

ADEMA CM, LOKER ES (2015). Digenean-gastropod host associations inform on aspects of specific immunity in snails. *Developmental e Comparative Immunology*, 48 (2): 275–283.

ALHO CJR, RONDON NL (1987). Habitats, population densities and social structure of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*: Rodentia) in the Pantanal, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 4:139-149.

ALVES DR, LUQUE JL, PARAGUASSU AR (2001). Metacercárias de *Clinostomum marginatum* (Digenea: Clinostomidae) em acará-bandeira *Pterophyllum scalare* (Osteichthyes: Cichlidae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Parasitología al día*, 25: 70-72.

ALVES PA, CHAMBRIER A, SCHOLZ T, LUQUE JL (2015). A new genus and species of proteocephalidean tapeworm (Cestoda), first parasite found in the driftwood catfish *Tocantinsia piresi* (Siluriformes: Auchenipteridae) from Brazil. *Folia Parasitologica*, DOI: 10.14411/fp.2015.006.

AMATO SB, REZENDE, HEB, GOMES DC, SERRA-FREIRE NM (1986). Epidemiology of *Fasciola hepatica* infection in the Paraíba River Valley, São Paulo, Brasil. *Veterinary Parasitology*, 22 (3-4): 275-284.

ANDERSON, RM (1978). The regulation of host population growth by parasitic species. *Parasitology*, 76: 119-157.

ALICATA JE (1962). Life cycle and development of *Philophthalmus gralli* in the intermediated and final hosts. *Journal of Parasitology*, 64: 47-54.

AMARAL D, BUSETTI ET (1979). Human fascioliasis hepatica in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 21: 141–145.

ARAÚJO FG, PEIXOTO MG, PINTO BCT, TEIXEIRA TP (2007). Distribution of guppies *Poecilia reticulata* (Peters, 1860) and *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) along a polluted stretch of the Paraíba do Sul River, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 69: 41-48.

ARGUEDAS-CORTÉS D, DOLZ G, ROMERO-ZÚÑIGA JJ, JIMÉNEZ-ROCHA AE, LEÓN-ALÁN D. (2010). *Centrocestus formosanus* (Opisthorchiida: Heterophyidae) como causa de muerte de alevines de tilapia gris *Oreochromis niloticus* (Perciforme: Cichlidae) en el Pacífico seco de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=0034-7744&script=sci_serial58 (4): 1453-1465.

AVELAR IO, SILVA APC, GARDINER C, SANTOS RL, LIMA WS, ECCO R (2015). Pathological and parasitological characterization of infection by trematodes (Paramphistomatidae) in the large intestine of capybaras. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 24 (3): 345-349.

AZCARATE, T (1980) Sociobiología y manejo del capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Donana Acta Vertebrata*, 7:1-228.

BARBIERI J (1989). Dinâmica da reprodução e crescimento de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) da Represa do Monjolinho, São Carlos/SP. *Revista Brasileira de Zoologia*, 6 (2): 225-233.

BARBOSA FS, PINTO HA, MELO AL (2011). *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) como hospedeiro intermediário de *Zygocotyle lunata* (Trematoda: Zygocotylidae) no Brasil. *Neotropical Helminthology*, 5: 240-245.

BARTON DP, BLAIR D. Family Notocotylidae Lu'he, 1909. In JONES A, BRAY RA, GIBSON DI (eds). *Keys to the Trematoda II* (2005). Natural History Museum, Londres. 729p.

BASCH PF (1969). *Cotylurus lutzi* sp. n. (Trematoda: Strigeidae) and its life cycle. *Journal of Parasitology*, 55 (3): 527-539.

BASCH PF, DI CONZA JJ, JOHNSON BE (1973). Strigeid trematodes (*Cotylurus lutzi*) cultured in vitro: production of normal eggs with continuance of life cycle. *Journal of Parasitology*, 59 (2): 319-322.

BENNEMA SC, SCHOLTE RGC, MOLENTO MB, MEDEIROS C, CARVALHO OS (2014). *Fasciola hepatica* in bovines in Brazil: data availability and spatial distribution. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56 (1): 35-41.

BESPROZVANNYKH VV, NGO HD, HA BV, HUNG NM, ROZHKOVAN KV, ERMOLENKO AV (2013). Descriptions of digenean parasites from three snail species, *Bithynia fuchsiana* (Morelet), *Parafossarulus striatulus* Benson and *Melanooides tuberculata* Müller, in North Vietnam. *Helminthologia*, 50 (3): 190-204.

BIK HM (2017). Let's rise up to unite taxonomy and technology. *PLoS Biology*, 15 (8). Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002231>.

BLAIR D, ISLAM KS (1983). The life-cycle and morphology of *Trichobilharzia australis* n.sp. (Digenea: Schistosomatidae) from the nasal blood vessels of the black duck (*Anas superciliosa*) in Australia, with a review of the genus *Trichobilharzia*. *Systematic Parasitology*, 5 (2): 89-117.

BLASCO-COSTA I, CUTMORE SC, MILLER TL, NOLAN MJ (2016). Molecular approaches to trematode systematics: 'best practice' and implications for future study. *Systematic Parasitology*, 93: 295–306.

BLASCO-COSTA I, LOCKE AS (2017). Life history, systematics and evolution of the Diplostomoidea Poirer, 1886: Progress, promises and challenges emerging from molecular studies. *Advances in Parasitology*, 98: 167-225.

BLASCO-COSTA I, POULIN R (2017). Parasite life-cycle studies: a plea to resurrect an old parasitological tradition. *Journal of Helminthology*. DOI:10.1017/S0022149X16000924.

BLASCO-COSTA I, SEPPÄLÄ K, FEIJEN F, ZAJAC N, KLAPPERT K, JOKELA J (2019). A new species of *Atriophallophorus* Deblock & Rosé, 1964 (Trematoda: Microphallidae) described from in vitro-grown adults and metacercariae from *Potamopyrgus antipodarum* (Gray, 1843) (Mollusca: Tateidae). *Journal of Helminthology*, 94: 1-15.

BONUTI MR, NASCIMENTO AA, MAPELLI EB, ARANTES IG (2002). Helintos gastrintestinais de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) na sub-região de Paiaguás, Pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*, 23: 57–62.

BOERO JJ, BOEHRINGER IK (1967). El parasitismo de nuestra fauna autóctona. II Los parasitos del carpincho (*Hydrochoerus hydrochaeris*) y del quiyá (*Myocastor coypus*). *Revista Facultad Ciencias Veterinaria de La Plata*, 21: 161-173.

BOORE J L (1999). Survey and summary animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27 (8): 1767–1780.

BORAY JC (1978). The potential impact of exotic *Lymnaea* spp. on fascioliasis in Australia. *Veterinary Parasitology*, 4: 127-141.

BORAY JC (2007). Liver fluke disease in sheep and cattle. *Primefacts- Profitable & Sustainable Primary Industries*, 446: 1-10.

BOWLES J, BLAIR D, MCMANUS P (1995). A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4 (2): 103-109.

BRAY RA, GIBSON DI, JONES A (2005). *Keys to the Trematoda III*. Natural History Museum. Londres, Reino Unido. 799pp.

BROOKS DR (2000). Parasite systematics in the 21st century: opportunities and

obstacles. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95 (1): 99–107.

BUSETTI ET (1982). Informações adicionais sobre a fasciolose hepática em Curitiba (Estado do Paraná, Brasil). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 24: 104-106.

CAIRA JN, LITTLEWOOD DTJ (2013). Worms, Platyhelminthes. *Encyclopedia of Biodiversity*, 7: 437-469.

CAFFARA M, LOCKE SA, GUSTINELLI A, MARCOGLIESE DJ, FIORAVANTI ML (2011). Morphological and molecular differentiation of *Clinostomum complanatum* and *Clinostomum marginatum* (Digenea: Clinostomidae) metacercariae and adults. *Journal of Parasitology*, 97 (5): 884–891.

CAFFARA M, LOCKE AS, ECHI PC, HALAJIAN A, BENINI D, LUUS-POWELL WJ, TAVAKOL S, FIOVANTI ML (2017). A morphological and molecular study of Clinostomid metacercariae from African fish with a redescription of *Clinostomum tilapiae*. *Parasitology*, 144: 1519-1529.

CARVALHO OS, COELHO PM, LENZI HL (2008). *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Editora Fiocruz. 1124pp.

CHAI JY, MURRELL KD, LYMBERY AJ (2005). Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *International Journal of Parasitology*, 35: 1233-1254.

CHAI JY (2013). Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: an update. *Journal of Infection. Chemother*, 45: 32-43.

CASAS MC, ZALLES M, PATRICK MJ, DAILEY M (1995). Intestinal helminths of capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) from Bolivia. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 62: 87–88.

CHAI JY, SOHN WM, YONG TS, EOM KS, MIN DY, LEE MY, LIM H, INSISIENGMAY B, PHOMMASACK B (2013). *Centrocestus*

formosanus (Heterophyidae): human infections and the infection source in Lao PDR. ***Journal of Parasitology***, 99 (3): 531-536.

CHARLIER J, VERCRUYSSSE J, MORGAN E, VAN DIJK J, WILLIAMS DJL (2014). Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. ***Parasitology***, 141: 326-335.

CHAUDHARY A, GUPTA S, VERMA C, TRIPATHI R, SINGH HS (2017). Morphological and molecular characterization of metacercaria of *Tylodelphys* (Digenea: Diplostomidae) from the piscine host, *Mystus tengara* from India. ***Journal of Parasitology***, 103 (5): 565-573.

CHENG TC, SULLIVAN JT, HARRIS KR (1973). Parasitic castration of the marine prosobranch gastropod *Nassarius obsoletus* by sporocysts of *Zoogonus rubellus* (Trematoda): Histopathology. ***Journal of Invertebrate Pathology***, 21 (2): 183-190.

CHIBWANA FD, BLASCO-COSTA I, GEORGIEVA S, HOSEA KM, NKWENGULILA G, SCHOLZ T, KOSTADINOVA A (2013). A first insight into the barcodes for African diplostomids (Digenea: Diplostomidae): Brain parasites in *Clarias gariepinus* (Siluriformes: Clariidae). ***Infection, Genetics and Evolution***, 17: 62–70.

CHING HL (1961). The development and morphological variation of *Philophthalmus gralli* Mathis and Leger, 1910 with a comparison of species of *Philophthalmus* Looss, 1899. ***Proceedings of the Helminthological Society of Washington***, 28, 130–138.

CHOUDHURY A, AGUIRRE-MACEDO ML, CURRAN SS, OSTROWSKI DE NÚÑEZ M, OVERSTREET RM, PÉREZ-PONCE DE LÉON G, SANTOS CP (2018). Trematode diversity in freshwater fishes of the Globe II: ‘New World’. ***Systemic Parasitology***, 93: 271–282.

CHUAH C, JONES MK, BURKE ML, MCMANUS DP, GOBERT GN (2014). Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. ***Trends in Parasitology***, 30 (3): 141-150.

CHURCH ML, BARRETT PM, SWENSON J, KINSELLA JM, TKACH VV (2013). Outbreak of *Philophthalmus gralli* in four greater rheas (*Rhea americana*). *Veterinary Ophthalmology*, 16: 65–72.

COHEN SC, FERNANDES BMM, GIBSON D, BRAY RA, PINTO HA, CAMPIÃO KM, JUSTO M (2020). **Trematoda** *In Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil*. PNUD. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/79>.

CORRÊA F, PIEDRAS SRN (2009). Alimentação de *Hoplais* aff. *malabaricus* (Bloch, 1794) e *Oligosarcus robustus* Menezes, 1969 em uma lagoa sob influência estuarina, Pelotas, RS. *Biotemas*, 22 (3): 121-128.

COSTA HMA, LEITE ACR, GUIMARÃES MP, LIMA WS (1986). Distribuição de helmintos parasitos de animais domésticos no Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 38 (4): 465-579.

COSTA CAF, CATTO JB (1994). Helmintos parasitos de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) na sub-região da Nhecolândia, Pantanal Sul Matogrossense. *Revista Brasileira de Biologia*, 54: 39-48.

CRIBB TH, ANDERSON GR, ADLAR RD, BRAY RA (1998). A DNA-based demonstration of a three-host life-cycle for the Bivesiculidae (Phlathyhelminthes: Digenea). *International Journal for Parasitology*, 28: 1791-1795.

CRIBB TH, BRAY RA, LITTLEWOOD DTJ (2001). The nature and evolution of the association among digeneans, molluscs and fishes. *International Journal for Parasitology*, 31: 997-1011.

CRIBB TH, BRAY RA, OLSON PD, LITTLEWOOD (2003). Life cycle evolution in the digenea: a new perspective from phylogeny. *Advances in Parasitology*, 54: 197-254.

CRISCIONE CD, POULIN R, BLOUIN MS (2005). Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology*, 14: 2247-2257.

CUERVO PF, CATALDO SD, FANTOZZI MC, DEIS E, ISENATH GD, VIBERTI G (2015). Liver fluke (*Fasciola hepatica*) naturally infecting introduced European brown hare (*Lepus europaeus*) in northern Patagonia: Phenotype, prevalence and potential risk. *Acta Parasitologica*, 60 (3): 536-543.

CUNHA AS (1970). *Esquistossomose mansoni*. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo, 435pp.

DAVIES D, OSTROWSKI DE NÚÑES M (2012). The life cycle of *Australapatemon magnacetabulum* (Digenea: Strigeidae) from Northwestern Argentina. *Journal of Parasitology*, 98 (4): 778-783.

DAYAN AD (2003). Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, 86: 141–159.

DAYRAT B (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85: 407-415.

D'ANDREA OS, MAROJA LS, GENTILE R, CERQUEIRA R, MALDONADO AJ, REY L (2000). The parasitismo of *Schistosoma mansoni* (Digenea-Trematoda) in a naturally infected population of water rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia-Sigmodontinae) in Brazil. *Parasitology*, 120 (6): 573-582.

DEANE MP (1955). Adolf Lutz, Helminthologist. *Revista do Instituto Adolf Lutz*, 73-85. Disponível em: < http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/50/rial-151-2_1955/f213.pdf >.

DIAS KGA, MÜLLER MI, ALMEIDA AC, SILVA RJ, AZEVEDO RK, PÉREZ-PONCE DE LEÓN G, ABDALLAH VD (2018). A new species of *Wallinia* Pearse, 1920 (Digenea: Allocreadiidae) collected from *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) and *A. lacustris* Lucena and Soares, 2016 (Characiformes: Characidae) in Brazil based on morphology and DNA sequences. *Parasitology Research*, 117: 2847–2854.

DÍAZ MT, HERNÁNDEZ LE, BASHIRULLAH AK (2002). Experimental life cycle of *Philophthalmus gralli* (Trematoda: Philophthalmidae) in Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 50: 629–641.

DRACZ RM, RIBEIRO VM, PEREIRA CA, LIMA WS (2016). Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Linnaeus, 1766) in Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 25: 364–367.

DRONEN NO, BLEND CK (2015). Updated keys to the genera in the subfamilies of Cyclocoelidae Stossich, 1902, including a reconsideration of species assignments, species keys and the proposal of a new genus in Szidatitreminae Dronen, 2007. *Zootaxa*, 4053: 1-100.

DUBOIS G (1959) Revision des Cyclocoelidae Kossack 1911. *Revue Suisse de Zoologie* 66, 67–147.

DUTTON HR, WARREN MB, BULLARD SA (2019). New genus and species of turtle blood fluke (Platyhelminthes: Digenea: Schistosomatoidea) infecting six-tubercled Amazon River turtles, *Podocnemis sextuberculata* (Pleurodira: Podocnemididae) from the Amazon River basin (Peru). *Journal of Parasitology*, 105 (5): 671–685.

EDLER FC (2011). **A medicina no Brasil imperial: clima, parasitas e patologia tropical**. *Monografia*. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 298 pp.

EHLERS U (1985). Phylogenetic relationships within the Platyhelminthes. In: *The origins and relationships of lower Invertebrates*. Morris SD, George JD, Gibson R, Platt HM (Eds.). Oxford, Oxford University, 143-158.

EIRAS JC, DIAS ML, PAVANELLI GC, MACHADO MH (1999). Histological studies on the effects of *Clinostomum marginatum* (Digenea: Clinostomidae) in its second intermediate host *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae) of the upper Paraná, Brazil. *Acta Scientiarum*, 21: 237-241.

EL-KOUBA MMAN, MARQUES SMT, PILATI C, HAMANN W (2008). Aspectos da fasciolose e de endoparasitas em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris* Linnaeus, 1766) de três parques no Paraná, Brasil. *Veterinária em Foco*, 6: 4–15.

ESCH GW, HAZEN TC, MARCOGLIESE DJ, GOATER TM, CREWS AE (1986). A long-term study on the population biology of *Crepidostomum cooperi* (Trematoda: Allocreadidae) in the burrowing mayfly, *Hexagenia limbata* (Ephemeroptera). *The American Midland Naturalist*, 116 (2): 304-314.

ESCH GW, BARGER MA, FELLIS KJ (2002). The transmission of digenetic trematodes: style, elegance, complexity. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 304-312.

ETGES FJ (1992). *Zygocotyle lunata*, laboratory maintenance in snails and mice. *Journal of Helminthology*, 59: 22-24.

FACON B, POINTIER JP, GLAUBRECHT M, POUX C, JARNE P, DAVID P (2003). A molecular phlogeography approach to biological invasions of the New World by parthenogenetic thiarid snails. *Molecular Ecology*, 12 (11): 3025-3039.

FENWICK A (1969). Baboons as reservoir hosts of *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 63: 557–567.

FERNANDES BMM (1976). Sobre as espécies brasileiras da família Cyclocoelidae Kossak, 1911 (Trematoda: Cyclocoelidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 74 (3-4): 289-294.

FERNANDES BMM, JUSTO CN, CÁRDENAS MQ, COHEN SC (2015). *South American trematodes parasites of birds and mammals*. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 516pp.

FLINK H, BEHRENS JW, SVENSSON A (2017). Consequences of eye fluke infection on anti-predator behaviours in invasive round gobies in Kalmar Sound. *Parasitology Research*, DOI 10.1007/s00436-017-5439-5.

FLORES V, SEMENAS L (2002). Infection patterns of *Tylodelphys bariloensis* and *T. crubensis* (Trematoda: Diplostomatidae) metacercariae in *Galaxias maculatus* (Osmeriformes: Galaxiidae) from two Patagonian lakes and observations on their geographical distribution in the Southern Andean Region, Argentina. ***Journal of Parasitology***, 88 (6): 1135-1139.

FLORES VR, BRUGNI N, RAUQUE CA (2007). Redescription of *Hyppocrepis myocastoris* (Digenea: Notocotylidae) in the coypu *Myocastor coypus* (Rodentia: Notocotylidae) from Patagonia, Argentina. ***Comparative Parasitology***, 74 (2): 233-236.

FREDRICKSON LH (1971). Common gallinule breeding biology and development. ***The Auk***, 88 (4): 914-919.

FREITAS M (1981). ***Helmintologia Veterinária***. Precisa Editora Gráfica LTDA. Belo Horizonte. 5ed, 396pp.

FREITAS JR, SANTOS MBL, LIMA LZ, ROCHA LA, SOUZA CF (1991). Distribuição dos moluscos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* na bacia da Pampulha, Belo Horizonte- atualização de dados. ***Ciência e Cultura***, 43: 641-43.

FREITAS JR, SANTOS MBL (1995). Current advances on the study of snail-snail interactions, with special emphasis on competition process. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***, 90 (2): 261-269.

FRIED B, STABLEFORD LT (1971). Cultivation of helminths in chick embryos. ***Advances in Parasitology***, 30: 109-165.

FRIED B, FRAZER BA, LEE MS, SHERMA J (1998). Thin-layer chromatography and histochemistry analyses of neutral lipids in *Helisoma trivolvis* infected with species of larval trematodes. ***Parasitology Research***, 84: 369-373.

FRIED B, HUFFMAN J, KEELER S, PEOPLES RC (2009). The biology of the caecal trematode *Zygocotyle lunata*. ***Advances in Parasitology***, 69: 1-40.

GALAKTIONOV KV, DOBROVOLSKIJ AA (2003). The Trematode life cycle as a system of adaptations. In: Fried B, Graczyk TK (Eds) *The biology and Evolution of Trematodes*. Springer. Dordrecht, Netherlands. 592pp.

GALOSI L, HENEBERG P, ROSSI G, SITKO J, MAGI GE, PERRUCCI S (2019). Air sac trematodes: *Morishitium polonicum* as a newly identified cause of death in the common blackbird (*Turdus merula*). *IJP: Parasites and Wildlife*, 9: 74–79.

GARCÍA-VARELA M, SERENO-URIBE AL, PINACHO-PINACHO CD, DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ O, PÉREZ-PONCE DE LEÓN G (2015). Molecular and morphological characterization of *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen, 2009 (Digenea: Diplostomatidae), a parasite of cormorants in the Americas. *Journal of Helminthology*. DOI: 10.1017/S0022149X1500005X.

GAYO V, CUERVO P, ROSADILLA D, BIRRIEL S, DELL'OCA L, TRELLES A (2011). Natural *Fasciola hepatica* infection in nutria (*Myocastor coypus*) in Uruguay. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 42 (2): 354-356.

GEORGIEVA S (2012). An integrative taxonomic approach to the study of trematode diversity and life-cycles in freshwater ecosystems. *Thesis*. Institute of Parasitology, Biology Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic. 167pp.

GEORGIEVA S, SELBACH C, FALTÝNKOVÁ A, SOLDÁNOVÁ M, SURES B, SKÍRNISSON B, KOSTADINOVA A (2013). New cryptic species of the 'revolutum' group of *Echinostoma* (Digenea: Echinostomatidae) revealed by molecular and morphological data. *Parasites & Vectors*, 6: 64.

GEORGIEVA S, FALTÝNKOVÁ A, BROWN R, BLASCO-COSTA I, SOLDÁNOVÁ M, SITKO J, SCHOLZ T, KOSTADINOVA T (2014). *Echinostoma 'revolutum'* (Digenea: Echinostomatidae) species complex revisited: species delimitation based on novel molecular and morphological data gathered in Europe. *Parasites & Vectors*, 7: 520.

GIBSON DI, JONES A, BRAY RA (2005). *Keys to the Trematoda I*. Natural History

Museum. Londres, Reino Unido. 516pp.

GOMEZ-PUERTA LA, SALAS MY, LOPEZ-URBINA MT, GONZALEZ AE (2018). Diagnóstico morfológico y molecular de *Cyclocoelum mutabile* (Trematoda: Cyclocoelidae) em el Perú. *Revista Peruana de Biología*, 25 (3): 315-320.

GOMEZ A, NICHOLS E (2013). Neglected wild life: parasitic biodiversity as a conservation target. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2: 222-227.

GONCHAR A, JOUET D, SKÍRNISSON K, KRUPENKO D, GALAKTIONOV KV (2019). Transatlantic discovery of *Notocotylus atlanticus* (Digenea: Notocotylidae) based on life cycle data. *Parasitology Research*, 118: 1445–1456.

GONZÁLEZ-ACUÑA D, MORENO L, CICCHINO A, MIRONOV S, KINSELLA M (2010). Checklist of the parasites of the black-necked swan, *Cygnus melanocoryphus* (Aves: Anatidae), with new records from Chile. *Zootaxa*, 2637: 55-68.

GOODCHILD CG, KIRK D (1960). The life cycle of *Spirorchis elegans* Stunkard, 1923 (Trematoda: Spirorchiiidae) from the painted turtle. *Journal of Parasitology*, 46: 219-229.

GOTELLI NJ (2004). A taxonomic wish-list for community ecology. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*, 359: 585–597.

GREVE JH, HARRISON GH (1980). Conjunctivitis caused by eye flukes in captive reared ostriches. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 177: 909–910.

HAMS E, AVIELLO G, FALLON PG (2013). The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Frontiers in immunology*, 4 (89): DOI: 10.3389/fimmu.2013.00089.

HAYES, K.A., COWIE, R.H., THIENGO, S.C. & STRONG, E.E. (2012). Comparing apples with apples: clarifying the identities of two highly invasive Neotropical

Ampullariidae (Caenogastropoda). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 166: 723-753.

HEIMSATH SF, LÓPEZ DE CASENAVE J, CUETO VR, CITTADINO EA (1993). Uso de hábitat en *Fulica armillata*, *Fulica leucoptera* y *Gallinula chloropus* durante la primavera. *Hornero*, 13(4): 286-289.

HENEBERG P, CASERO M, WAAP H, SITKO J, AZEVEDO F, TESINSKY M, LITERÁK I (2018). An outbreak of philophthalmosis in *Larus michahellis* and *Larus fuscus* gulls in Iberian Peninsula. *Parasitology International*, (67): 253–261.

HERNANDEZ-MENA D, GARCÍA-PRIETO L, GARCÍA-VARELA M (2014). Morphological and molecular differentiation of *Parastrigea* (Trematoda: Strigeidae) from Mexico, with the description of a new species. *Parasitology International*, 63: 315–323.

HERNÁNDEZ-MENA DI, GARCÍA-VARELA M, PÉREZ-PONCE DE LEÓN G (2017). Filling the gaps in the classification of the Digenea Carus, 1863: systematic position of the Proterodiplostomidae Dubois, 1936 within the superfamily Diplostomoidea Poirier, 1886, inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Systematic parasitology*, 94: 833-848.

HERNÁNDEZ-CRUZ E, HERNÁNDEZ-ORTS J, SERENO-URIBEAL, PÉREZ-PONCE DE LEÓN G, GARCÍA-VARELA M (2018). Multilocus phylogenetic analysis and morphological data reveal a new species composition of the genus *Drepanocephalus* Dietz, 1909 (Digenea: Echinostomatidae), parasites of fish-eating birds in the Americas. *Journal of Helminthology*. Disponible en: <https://doi.org/10.1017/S0022149X17000815>.

HILLIS, DM, DAVIS SK (1986). Evolution of ribosomal DNA: fifty million years of recorded history in the frog genus *Rana*. *Evolution*, 40: 1275-1288.

HILLIS DM, DIXON MT (1991). Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66 (4): 411-453.

HORÁK, P, MIKES L, LICHTENBERGOVÁ L, SKÁLA V, SOLDANOVÁ M, BRANT SV (2015). Avian schistosomes and outbreaks of cercarial dermatitis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1): 165-190.

HOYOS CFE, BENAVIDES YMH AND GARAY ODV (2017). Primer registro de *Typhlocoelum cucumerinum* (Trematoda: Typhlocoelidae) en *Cairina moschata domestica* (Aves: Anatidae) en Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 33: 35–41.

HSU KC, LIE JL, BASCH PF (1968). The life history of *Echinostoma rodriguessi* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). *The Journal of Parasitology*, 54(2)333-339.

HUGGHINS EJ (1954). Life history of a strigeid trematode, *Hysteromorpha triloba* (Rudolphi, 1819) Lutz, 1931. I- Egg and miracidium. *Transactions of the American Microscopical Society*, 73 (1) 1-15.

IGREJA RP, MUNIZ-BARRETO G, M. SOARES S (2004). Fascioliasis: Report of two cases from rural areas of Rio de Janeiro. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, 37 (5): 416-417.

INOBAYA MT, OLVEDA RM, CHAU TNP, OLVEDA DU, ROSS AGP (2014). Prevention and control of schistosomiasis: a current perspective. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 5: 65-75.

ISMAIL NS, ISSA IM (1987). Development, growth, and migration of *Philophthalmus gralli* (Trematoda) from Jordan in the eyes of chicks. *Journal Helminthology*, 61: 163-168.

IZRAILSKAIA AV, BESPROZVANNYKH VV, TATONOVA YV, NGUYEN HM, NGO HD (2019). Developmental stages of *Notocotylus magniovatus* Yamaguti, 1934, *Catatropis vietnamensis* n. sp., *Pseudocatatropis dvoryadkini* n. sp., and phylogenetic relationships of Notocotyliidae Luhe, 1909. *Parasitology Research*, 118: 469-481.

JANNOTTI-PASSOS LK., VIDIGAL THDA. E. DIAS-NETO, PENA SD, SIMPSON AJ, DUTRA WO, SOUZA CP, CARVALHO-PARRA JF (1997). PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails. *Journal of Parasitology*, 83 (3): 395–399.

JANOUSKOVEC J, KEELING PJ (2016). Evolution: causality and the origin of parasitism. *Current Biology*, 26: 157-179.

JOHNSON PTJ, SUTHERLAND DR (2003). Amphibian deformities and *Ribeiroia* infection: an emerging helminthiasis. *Trends in Parasitology*, 19 (8): 332-335.

JOHNSON PTJ, LUNDE KB, THURMAN EM, RITCHIE EG, WRAY SN, SUTHERLAND DR, KAPPER JM, FREST TJ, BOWERMAN J, BLAUSTEIN AR (2002). Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the Western United States. *Ecological Monographs*, 72 (2): 151-168.

JONES A, SENG LT (1986). Amphistomes from Malaysian fishes, including *Osteochilotrema malayae* gen. nov. sp. nov. (Paramphistomidae: Osteochilotrematinae subfam. nov.). *Journal of Natural History*, 20(1): 117-129.

JONES A. (2005). Family Fasciolidae Railliet, 1895 In JONES A, BRAY RA, GIBSON DI (2005). *Keys to the Trematoda II*. Natural History Museum. Londres, Reino Unido.

JONES A, BRAY RA, GIBSON DI (2005). *Keys to the Trematoda II*. Natural History Museum. Londres, Reino Unido. p. 79-85.

KANEV I, NOLLEN P, VASSILEV I, RADEV V, DIMITROV V (1993). Redescription of *Philophthalamus lucipetus* (Rudolphi, 1819) (Trematoda: Philophthalmidae) with a discussion of its identity and characteristics. *Annalen Naturhistorischen Museums Wien*, 94: 11-34.

KANEV I (1994). Life-cycle, delimitation and redescription of *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) (Trematoda: Echinostomatidae). *Systematic Parasitology*, 28: 125-144.

KANEV I, RADEV V, PRIED B (2005a). Family Clinostomidae Lühe, 1901 *In* Gibson DI, Jones A, Bray RA (2005) **Keys to the Trematoda I**. Natural History Museum. Londres, Reino Unido. p.113-120.

KANEV I, RADEV V, PRIED B (2005b). Family Cyclocoelidae Stossich, 1902 *In* Gibson DI, Jones A, Bray RA (2005) **Keys to the Trematoda I**. Natural History Museum. Londres, Reino Unido. p.131-145.

KANEV I, RADEV V, FRIED B (2005c). Family Typhlocoelidae Harrah, 1922 *In* Gibson DI, Jones A, Bray RA (2005) **Keys to the Trematoda I**. Natural History Museum. Londres, Reino Unido. p.153-158.

KANEV I, FRIED B, RADEV V (2009). Collar spine models in the genus *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, 105: 921–927.

KARESH WB, DOBSON A, LLOYD-SMITH JO, LUBROTH J, DIXON MA, BENNET M, ALDRICH S, HARRINGTON T, FORMENTY P, LOH EH, MACHALABA CC, THOMAS MJ, HEYMANN DL (2012). Zoonoses 1- Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. **The Lancet** 1, 38D (9857): 1936-1945.

KHAN S, AHMED S, SERAJUDDIN M, SAIFULLAH MK (2018). Variation in seasonal prevalence and intensity of progenetic metacercariae of *Clinostomum complanatum* infection in *Trichogaster fasciatus* fish. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, 7: 310–316.

KIRSCH R (1984). Treatment of nematodiasis in poultry and game birds with fenbendazole. **Avian Diseases**. 28: 311–318.

KOHN A, PEREIRA RCS (1970). Revisão do gênero *Hippocrepis* Travassos, 1922 (Trematoda). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 68: 1-7.

KOHN A, FERNANDES BMM, BAPTISTA-FARIAS MFD (1995). Metacercariae of *Diplostomum* (*Austrodiplostomum*) *compactum* (Trematoda, Diplostomidae) in the eyes of *Plagioscion squamosissimus* (Teleostei, Sciaenidae) from the reservoir of the

Hydroelectric Power Station of Itaipu, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90 (3): 341-344.

KOHN A, FERNANDES BM, COHEN SC (2007). *South American Trematodes Parasites of Fishes*. Fundação Oswaldo Cruz. 309pp.

KOMMA MD (1972). Revalidação da espécie *Echinostoma erraticum* (Lutz, 1924). *Revista Brasileira de Patologia Tropical*, 4 (1): 463-471.

KOPRIVNIKAR J, MARCOGLIESE DJ, ROHR JR, ORLOFSKE AS, RAFFEL TR, JOHNSON PTJ (2012). Macroparasite infections of amphibians: what can they tell us? *EcoHealth*, 9: 342-360.

KOSTADINOVA A, VAUCHER C, GIBSON DI (2002). Redescription of two echinostomes from birds in Paraguay, with comments on *Drepanocephalus* Dietz, 1909 and *Paryphostomum* Dietz, 1909 (Digenea: Echinostomatidae). *Systematic Parasitology*, 53: 147-158.

KOSTADINOVA A, HERNIOU EA, BARRETT J, LITTLEWOOD DTJ (2003). Phylogenetic relationships of *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) and related genera re-assessed via DNA and morphological analyses. *Systematic Parasitology*, 54: 159–176.

KOSTADINOVA A (2005). Family Echinostomatidae Looss, 1899 In Jones A, Bray RA, Gibson DI (2005) *Keys to the Trematoda II*. Natural History Museum. Londres, Reino Unido. p. 9-40.

KUDLAI O, CUTMORE SC, CRIBB TH (2015). Morphological and molecular data for three species of the Microphallidae (Trematoda: Digenea) in Australia, including the first descriptions of the cercariae of *Maritrema brevisacciferum* Shimazu et Pearson, 1991 and *Microphallus minutus* Johnston, 1948. *Folia Parasitologica*, 62, DOI: 10.14411/fp.2015.053.

KUMAR S, STECHER G, TAMURA K (2016). MEGA 7: Molecular Evolutionary

Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, 33 (7): 1870-1874.

LABRUNA MB, COSTA FB, PORT-CARVALHO M, OLIVEIRA AS, SOUZA SLP, CASTRO MB (2018). Lethal fascioliasis in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. *Journal of Parasitology*, 104: 173-176.

LAFFERTY KD, MORRIS AK (1996). Altered behavior of parasitized killifish increases susceptibility to predation by bird final hosts. *Ecology*, 77: 1390-1397.

LAFFERTY KD, KURIS AM (2009). Parasitic castration: the evolution and ecology of body snatchers. *Trends in Parasitology*, 25 (12): 564-572.

LAIDEMITT MR, ZAWADZKI ET, BRANT SV, MUTUKU MW, MKO GM, LOKER ES (2017). Loads of trematodes: discovering hidden diversity of paramphistomoids in Kenyan ruminants. *Parasitology*, 144: 131–147.

LAIDEMITT MR, ANDERSON LC, WEARING HJ, MUTUKU MW, MKOJI GM, LOKER ES (2019). Antagonism between parasites within snail hosts impacts the transmission of human schistosomiasis. *eLife: Ecology Epidemiology and Global Health*, DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.50095>.

LAIMANOVICH RC, BELTZER AH (1993). Aporte al conocimiento de la biología alimentaria de la Pollona Negra (*Gallinula chloropus*) en el Paraná Medio, Argentina. *Hornero*, 13 (4): 289-291.

LATINI AO, PETRERE MJ (2004). Reduction of a native fish fauna by alien species: an example from Brazilian freshwater tropical lakes. *Fisheries Management and Ecology*, 11: 71–79.

LAWRENCE K (1983). Efficacy of fenbendazole against nematodes of captive birds. *Veterinary Research*, 112: 433–434.

LE TH, BLAIR D, MCMANUS DP (2002). Mitochondrial genomes of parasitic Flatworms. *Trends in Parasitology*, 18 (5): 206-213.

LEIBOWITZ MP, SANTOS NRV, TAVARES GC, ASSIS GBN, DORELLA FA, FIGUEIREDO HCP, LEAL CAG (2019). Severe outbreak of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in farm-raised ornamental platies *Xiphophorus maculatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 134 (2): 107-111.

LEMLY AD, ESCH GW (1985). Black-spot caused by *Uvulifer ambloplitis* (Trematoda) among juvenile centrarchids in the Piedmont area of North Carolina. *Proceedings of Helminthology Society Washington*, 52 (1): 30-35.

LI K, CLAUSEN JH, MURRELL KD, LIU L, DALSGAARD (2013). Risks for fishborne zoonotic trematodes in Tilapia production systems in Guangdong province, China. *Veterinary Parasitology*, 198: 223-229.

LIMA WS, SOARES LRM, BARÇANTE TA, GUIMARÃES MP, BARÇANTE JMP (2009). Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) infection in Brazilian cattle of Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18 (2): 27-30.

LIMA MCBC, LIRA RD, BARROS NHC, SILVA W, CHELLAPPA S (2017). Biologia reprodutiva do peixe traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Characiformes: Erythrinidae) no açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte, Brasil. *Biota Amazônia*, Macapá, 7 (2): 21-25.

LITTLEWOOD DTJ, CRIBB TH, OLSON PD, BRAY RA (2001). Platyhelminth phylogenetics – a key to understanding parasitism? *Belgian Journal of Zoology*, 131 (1): 35-46.

LIU Q, WEI F, LIU W, YANG S, ZHANG X (2008). Paragonimiasis: an important food-borne zoonosis in China. *Trends in Parasitology*, 24: 318–323.

LIVEZEY BC (2003). Evolution of flightlessness in rails (Gruiformes: Rallidae): Phylogenetic, ecomorphological, and ontogenetic perspectives. (Thesis).

Ornithological Monographs: The American Ornithologists' Union, Washington, EUA. 666pp.

LOCKE SA, MCLAUGHLIN DM, MARCOGLIESE DJ (2010). DNA barcodes show cryptic diversity and a potential physiological basis for host specificity among Diplostomoidea (Platyhelminthes: Digenea) parasitizing freshwater fishes in the St. Lawrence River, Canada. *Molecular Ecology*, 19: 2813-2827.

LOCKE SA, MCLAUGHLIN DM, LAPIERRE AR, JOHNSON PTJ, MARCOGLIESE DJ (2011). Linking larvae and adults of *Apharyngostrigea cornu*, *Hysteromorpha triloba*, and *Alaria mustelae* (Diplostomoidea: Digenea) using molecular data. *Journal of Parasitology*, 97 (5): 846-851.

LOCKE SA, CAFFARA M, MARCOGLIESE DJ, FIORAVANTI ML (2014). A large-scale molecular survey of *Clinostomum* (Digenea, Clinostomidae). *Zoologica Scripta*, DOI:10.1111.

LOPES AS; PULIDO-MURILLO EA; MELO AL; PINTO HA (2020). *Haplorchis pumilio* (Trematoda: Heterophyidae) as a new fish-borne zoonotic agent transmitted by *Melanooides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) in Brazil: a morphological and molecular study. *Infection Genetics and Evolution*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104495>.

LÓPEZ-HERNANDEZ D, LOCKE SA, MELO AL, RABELO EML, PINTO HA (2018). Molecular, morphological and experimental assessment of the life cycle of *Posthodiplostomum nanum* Dubois, 1937 (Trematoda: Diplostomidae) from Brazil, with phylogenetic evidence of the paraphyly of the genus *Posthodiplostomum* Dubois, 1936. *Infection Genetics and Evolution*, 63: 95-103.

LÓPEZ-HERNANDEZ D, LOCKE SA, ASSIS JCA, DRAGO FB, MELO AL, RABELO EML, PINTO HA (2019). Molecular, morphological and experimental-infection studies of cercariae of five species in the superfamily Diplostomoidea (Trematoda: Digenea) infecting *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) in Brazil. *Acta Tropica*, 199: 105082.

LÓPEZ-JIMÉNEZ A, PÉREZ-PONCE L, GARCÍA-VARELA M (2018a). Molecular data reveal high diversity of *Uvulifer* (Trematoda: Diplostomidae) in Middle America, with the description of a new species. *Journal of Helminthology*, 92: 725-739.

LÓPEZ-JIMÉNEZ A, GARCÍA-VARELA M, HERNÁNDEZ-ORTZ J (2018b). Review of five species of cyclocoelids (Digenea: Cyclocoelidae) from aquatic birds in Mexico with notes on their interspecific variation. *Systematic Parasitology*, 95: 921–942.

LUNASCHI LI, CREMONTE F, DRAGO F (2007). Checklist of digenean parasites of birds from Argentina. *Zootaxa*, 1403: 1-36.

LUTON K, WALKER D, BLAIR D (1992). Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 56: 323-328.

LUTZ, A (1919). O *Schistosomum mansoni* e a Schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 11: 121-155.

LUTZ, A (1924). Estudos sobre a evolução dos endotrematodes brasileiros. Parte especial: 1. Echinostomatidae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 17: 55-73.

LUTZ A (1933). Notas sobre dicranocercarias brasileiras. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 27: 349-402.

MA J, HE JJ, LIU GH, BLAIR D, LIU LZ, LIU Y, ZHU XQ (2016). Mitochondrial genome of *Ogmocotyle sika* and implications for phylogenetic studies of the Notocotylidae trematodes. *Infection, Genetics and Evolution*, 37: 208–214.

MAGALHÃES KG, JANNOTTI-PASSOS LK, CARVALHO OS (2004). Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99 (4): 421-424.

MALDONADO-JÚNIOR A, VIEIRA GO, GARCIA JS, REY L, LANFREDI RM (2001). Biological aspects of a new isolate of *Echinostoma paraensei* (Tremadota: Echinostomatidae): susceptibility of sympatric snails and the natural vertebrate host. *Parasitology Research*, 87 (10): 853-859.

MALDONADO-JÚNIOR A, VIEIRA GO, LANFREDI RM (2003). *Echinostoma luisreyi* n. sp. (Platyhelminthes: Digenea) by light and scanning electron microscopy. *Journal of Parasitology*, 89: 800-808.

MARCOGLIESE DJ, GOATE, TM, ESCH GW (1990). *Crepidostomum cooperi* (Allocreadidae) in the burrowing mayfly, *Hexagenia limbata* (Ephemeroptera) related to trophic status of a lake. *American Midland Naturalist*, 124: 309-317.

MARCOGLIESE DJ (2001). Implications of climate change for parasitism of animals in the aquatic environment. *Canadian Journal of Zoology*, 79: 1331–1352.

MARCOGLIESE DJ (2005). Parasites of the superorganism: Are they indicators of ecosystem health? *International Journal for Parasitology*, 35: 705-716.

MARIGO J, THOMPSON CC, SANTOS CP, IÑIGUEZ AM (2011). The Synthesium Brachycladiidae Odhner, 1905 (Digenea) association with hosts based on nuclear and mitochondrial genes. *Parasitology International*, 60: 530–533.

MARTINS IVF, SCOTT F, COUMENDOUROS K, GRISI L (2003). Eficácia do praziquantel no controle de cestoides de galinhas domésticas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 12: 58-60.

MARTINS IVF, AVELAR BR, BERNARDO CC, LEÃO AC, PEREIRA MJS (2014). Distribution of bovine fasciolosis and associated factors in south Espírito Santo, Brazil: an update. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23 (1): 23-29.

MAS-COMA MS, ESTEBAN JG, BARGUES MD (1999). Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organization*, 77 (4): 340-346.

MAS-COMA S, VALERO MA, BARGUES MD (2009). *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in Parasitology*, 69: 41–146.

MAS-COMA S, BARQUES MD, VALERO MA (2018). Human fasciolosis infection sources, their diversity, incidence factors, analytical methods and prevention measures. *Parasitology*, 145 (13): 1665-1699.

MATOS AMRN, LAVORENTE FLP, LORENZETTI E, FILHO MRCM, NÓBREGA DF, CHRYSAAFIDIS AL, OLIVEIRA AG, DOMIT C, BRACARENSE APFRL (2019). Molecular identification and histological aspects of *Renicola sloanei* (Digenea: Rencolidae) in *Puffinus puffinus* (Procellariiformes): a first record. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, Jaboticabal*, 28 (3): 367-375.

MCLAUGHLIN DJ (1976). Experimental studies on the life cycle of *Cyclocoelum mutabile* (Zeder) (Trematoda: Cyclocoelidae). *Canadian Journal of Zoology*, 54: 48-54.

MCLAUGHLIN DJ (1986). The biology of *Cyclocoelum mutabile* (Trematoda) infections in American Coots. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 53 (2): 177-181.

MEDEIROS C, SCHOLTE RGC, D'ÁVILA S, CALDEIRA RL, CARVALHO OS (2014). Spatial distribution of lymnaeidae (Mollusca, Basommatophora), intermediate host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematoda, Digenea) in Brazil. *Revista do Instituto Medicina Tropical de Sao Paulo*, 56 (3): 235-252.

MEISE K, GARCIA-PARRA C (2015). Behavioural and environmental correlates of *Philophthalmus zalophi* infections and their impact on survival in juvenile Galapagos sea lions. *Marine Biology*, 162: 2107–2117.

MEHMOOD K, ZHANG H, SABIR AJ, ABBAS RZ, IJAZ M, DURRANI AZ, SALEEM MH, REHMAN MU, IQBAL MK, WANG Y, AHMAD HI, ABBAS T, HUSSAIN R, GHORI MT, ALI S, KHAN AU, LI J (2017). A review on epidemiology, global

prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microbial Pathogenesis*, 109: 253-262.

MIKHEEV VN, PASTERNAK AF, TASKINEN J, VALTONEN ET (2010). Parasite-induced aggression and impaired contest ability in a fish host. *Parasites & Vectors*, 3: 17.

MILWARD-DE-ANDRADE R (1959). O problema da esquistossomose mansoni no lago artificial da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais (Brasil). *Revista Brasileira Malariologia e Doenças Tropicais*, 11: 653-674.

Ministério da Saúde (2014). *Vigilância da esquistossomose mansoni*. 4 ed., Brasília, 146pp.

MITCHELL AJ, SALMON MJ, HUFFMAN DG, GOODWIN AE, BRANDT TM (2000). Prevalence and pathogenicity of a heterophyid trematode infecting the gills of an endangered fish, the fountain darter, in two central Texas spring-fed rivers. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12 (4): 283-289.

MITCHELL AJ, OVERSTREET RM, GOODWIN AE, BRANDT TM (2005). Spread of an exotic fish-gill trematode: a far-reaching and complex problem. *Fisheries*, 30 (8): 11-16.

MIURA O, KURIS AM, TORCHIN ME, HECHINGER RF, DUNHAM EJ, CHIBA S (2005). Molecular-genetic analyses reveal cryptic species of trematodes in the intertidal gastropod, *Batillaria cumingi* (Crosse). *International Journal for Parasitology*, 35: 793-80.

MODENA CM, COELHO PMZ, BARBOSA FS, LIMA WS (1993). Transmission of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions using the bovine- *Biomphalaria glabrata*- bovine model. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35: 11-16.

MONTAG LFA, FREITAS TMS, RAIOL RDO, SILVA MV (2011). Length-weight relationship and reproduction of the guppy *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes:

Poeciliidae) in urban drainage channels in the Brazilian city of Belém. *Biota Neotropica*, 11(3): 93-98.

MOORE J (1987). Some roles of parasitic helminths in trophic interactions. A view from North America. *Revista Chilena de História Natural*, 60: 159-179.

MOREIRA JR, FERRAZ KMPMB, HERRERA EA, MACDONALD DW (eds) (2013). *Capybara: biology, use and conservation of an exceptional neotropical species*. Springer, Nova Iorque, 423p.

MORGAN JAT, BLAIR D (1998). Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacers and mitochondrial CO1 and ND1 genes for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda). *Parasitology*, 116 (3): 289-297.

MOSZCZYNSKA A, LOCKE SA, MCLAUGHLIN JD, MARCOGLIESE DJ, CREASE TJ (2009). Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. *Molecular Ecology Resources*, 9: 75-82.

MOURITSEN KN, POULIN R (2005). Parasites boost biodiversity and change animal community structure by trait-mediated indirect effects. *Oikos*, 108 (2): 344–350.

MÜLLER V, KIMMIG P, FRANK W (1993). Die wirkung von praziquantel auf *Trichobilharzia* (Digenea, Schistosomatidae), einen verursacher von badermatitiden beim menschen. *Applied Parasitology*, 34: 181-201.

MUKARATIRWA S, THOKOZANI H, CINDZI ZM, MAONONGA DB, TARUVINGA M, MATENGA E, (2005). First report of an outbreak of the oriental eye-fluke, *Philophthalmus gralli* (Mathis & Leger 1910), in commercially reared ostriches (*Struthio camelus*) in Zimbabwe. *Onderstepoort Journal Veterinay Research*, 72: 203-206.

MUNIZ-PEREIRA LC, AMATO SB (1993) *Philophthalmus gralli* (Digenea: Philophthalmidae) parasite of *Anas bahamensis* and *Amazonetta brasiliensis*, from

Lagoons of Maricá county, Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88: 567-569.

NADLER SA, PÉREZ-PONCE DE LÉON G (2011). Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. *Parasitology*, 138 (13): 1688-1709.

NASIR P (1962). On the identification of the cercaria of *Cotylurus brevis* Dubois and Raush, 1950, (Trematoda, Strigeida) and genitalia of the adult. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 29 (1): 82-87.

NASIR P, SCORZA JV (1966). Studies on freshwater larval trematodes. Part XIV. A new species of a strigeid cercaria, *Cercaria allotropicalis*, from Venezuela with a key to the related species. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 33 (1): 87-90.

NELSON GS (1960). Schistosome infections as zoonoses in Africa. Ordinary meeting. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 301-316.

NIEWIADOMSKA K (2005). Family Diplostomidae Poirier, 1886 In Gibson DI, Jones A, Bray RA (2005). *Keys to the Trematoda I*. Natural History Museum. Londres, Reino Unido. p.167-172.

NOLAN MJ, CRIBB TH (2005). The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of Digenean Species. *Advances in Parasitology*, 60: 101-163.

NOLLEN PM, MURRAY HD (1978). *Philophthalmus gralli*: identification, growth characteristics, and treatment of an oriental eye-fluke of birds introduced into the continental United States. *Journal of Parasitology*, 64: 178-180.

NOLLEN PM, KANEV I (1995). The taxonomy and biology of philophthalmid eye-flukes. *Advances in Parasitology*, 36: 206-242.

NORONHA D, SÁ MR, KNOFF M, MUNIZ-PEREIRA LC, PINTO RM (2009). *Adolpho Lutz e a Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz*. Museu Nacional, Rio de Janeiro, 154pp.

O'DWYER K, FALTÝNKOVÁ A, GEORGIEVA S, KOSTADINOVA A (2015). An integrative taxonomic investigation of the diversity of digenean parasites infecting the intertidal snail *Austrolittorina unifasciata* Gray, 1826 (Gastropoda: Littorinidae) in Australia. *Parasitology Research*, DOI 10.1007/s00436-015-4436-9.

OLGUÍN PF, BELTZER AH, ATTADEMO AM (2013). Biología alimentaria de algunas especies de rállidos (Rallidae) del valle de inundación del Río Paraná Medio. *Ornitología Neotropical*, 24: 15-26.

OLSON RE (1968). The life cycle of *Cotylurus erraticus* (Rudolphi, 1809) Szidat, 1928 (Trematoda: Strigeidae) and the effect of the metacercaria on rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Thesis*. Montana State University, Montana, USA. 50p.

OLSON SL (1973). A classification of the Rallidae. *The Wilson Bulletin*, 85(1): 37pp.

OLSON PD, CRIBB TH, TKACH VV, BRAY RA, LITTLEWOOD DTJ (2003). Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology*, 33: 733-755.

OLSON PD, TKACH VV (2005). Advances and trends molecular systematics of the parasitic Plathelminthes. *Advances in Parasitology*, 60: 165-243.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M (1976). Sobre el ciclo biológico de *Hippocrepis fuelleborni* Travassos y Vogelsang 1930 (Trematoda: Notocotylidae). *Physis*, 91: 125–130.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ M (1978). Fauna de agua dulce de la República Argentina. VII Cercarias de la familia Schistosomatidae (Trematoda, Digenea). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 2: 65-76.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ M (1981). Fauna de agua dulce de la República Argentina. X. Cercarias de las superfamilias Echinostomatoidea, Allocreadioidea y Microphalloidea (Trematoda, Digenea). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia*, 2: 1-9.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ M (1982). Die Entwicklungszyklen von *Diplostomum* (*Austrodiplostomum*) *compactum* (Lutz, 1928) und *D. (A.) mordax* (Szidat und Nani, 1951) n. comb in Sudamerika. *Zoologischer Anzeiger*, 208: 393-404.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ M (1989). The life history of a trematode, *Apharyngostrigea simplex* (Johnston 1904), from the ardeid bird *Egretta thula* in Argentina. *Zoologischer Anzeiger*, 222: 322-336.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ M, DAVIES D, SPATZ L (2011). The life cycle of *Zygocotyle lunata* (Trematoda, Paramphistomoidea) in the subtropical region of South America. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82: 581-588.

OTTONI FP (2013). Life colouration of three *Australoheros* species from the rio Paraíba do Sul basin, southeastern Brazil (Teleostei: Labroidei: Cichlidae). *Vertebrate Zoology*, 63 (1): 9-13.

OTTONI FP, KATZ AM (2017). Feeding ecology of the genus *Australoheros* (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae) based on examined specimens and literature information. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, 27: 13-18.

OYARZÚN-RUIZ P, ALVELO C, VERA F, MORONI M (2019). Histopathological findings of *Fasciola hepatica* infection in non-native European hare (*Lepus europaeus*) in Southern Chile. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 28 (1): 145-150.

PANTOJA C, SCHOLZ, LUQUE JL, JONES A (2019). First molecular assessment of the interrelationships of cladorchiid digeneans (Digenea: Paramphistomoidea), parasites of Neotropical fishes, including descriptions of three new species and new host and geographical records. *Folia Parasitologica*, 66: 011, DOI: 10.14411/fp.2019.011

PARAENSE WL (1970). Planorbídeos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. In: Cunha AS. **Esquistossomose mansoni**. São Paulo (SP): Editora da Universidade de São Paulo; 1970. 435pp.

PARAENSE WL (1983a). A survey of planorbid molluscs in the Amazonian region of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 78: <https://doi.org/10.1590/S0074-02761983000300011>

PARAENSE, W. L., AIRES DE ALENCAR, J. T., & CORRÊA, L. R. (1983b). Distribuição de planorbídeos e prevalência da xistossomose mansoni no Estado do Espírito Santo. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 78: 373-384.

PARAENSE WL, POINTIER JP (2003). *Physa acuta* Draparnaud, 1805 (Gastropoda: Physidae): a study of topotypic specimens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 513-517.

PEARSON DL, HAMILTON AL, ERWIN TL (2011). Recovery plan for the endangered taxonomy profession. *BioScience*, 61: 58–63.

PELEGRINI LS, GIÃO T, VIEIRA DHMD, MÜLLER MI, SILVA RJ, PÉREZ-PONCE DE LEÓN G, AZEVEDO RK, ABDALLAH VD (2019). Molecular and morphological characterization of the metacercariae of two species of diplostomid trematodes (Platyhelminthes, Digenea) in freshwater fishes of the Batalha River, Brazil. *Parasitology Research*, <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06362-2>.

PELLEGRINO J, FARIA J (1965). The oograma method for the screening of drugs in *Schistosoma mansoni*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 14: 363-369.

PENNYCUICK L (1971). Quantitative effects of three species of parasites on a population of Three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Journal of Zoology, London*, 165: 143-162.

PEREIRA BB, OLIVEIRA EA (2014). Determinação do potencial larvófago de *Poecilia*

reticulata em condições domésticas de controle biológico. **Caderno de Saúde Coletiva**, 22 (3): 241-245.

PÉREZ- PONCE DE LEÓN G, NADLER SA (2010). What we don't recognize can hurt us: a plea for awareness about cryptic species. **Journal of Parasitology**, 96 (2): 453-464.

PÉREZ-PONCE DE LEÓN G, GARCÍA-VARELA M, PINACHO-PINACHO CD, SERENO-URIBE AL, POULIN R (2016). Species delimitation in trematodes using DNA sequences: Middle-American *Clinostomum* as a case study. **Parasitology**, 143: 1773–1789.

PÉREZ-PONCE DE LEÓN G, HERNÁNDEZ-MENA DI (2019). Testing the higher-level phylogenetic classification of Digenea (Platyhelminthes, Trematoda) based on nuclear rDNA sequences before entering the age of the 'next-generation' Tree of Life. **Journal of Helminthology**, 93(3): 260-276.

PESSÔA SB, MARTINS AV (1982). **Pessoa Parasitologia Médica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 11: 872p.

PINTO HA, MELO AL (2010). *Melanoides tuberculata* as intermediate host of *Philophthalmus gralli* in Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical**, 52 (6): 323-327.

PINTO HA, MELO AL (2012a). Metacercariae of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in *Australoheros facetus* (Pisces: Cichlidae) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 21: 334-337.

PINTO HA, MELO AL (2012b). Infecção natural de *Poecilia reticulata* (Actinopterygii: Poeciliidae) por metacercárias na Represa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, 38: 257-264.

PINTO HA, MELO AL (2012c). *Physa marmorata* (Molusca: Physidae) como hospedeiro intermediário de *Echinostoma exile* (Trematoda: Echinostomatidae) no Brasil. **Neotropical Helminthology**, 6: 291-299.

PINTO, HA (2013). Biologia e taxonomia de trematódeos transmitidos por moluscos dulceaquícolas na represa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Thesis*. Universidade Federal de Minas Gerais. 300pp.

PINTO HA, MELO AL (2013a). Larvas de trematódeos em moluscos do Brasil: panorama e perspectivas após um século de estudos. *Revista de Patologia Tropical*, 42 (4):369-386.

PINTO HA, MELO AL (2013b). A checklist of cercariae (Trematoda: Digenea) in molluscs from Brazil. *Zootaxa* 3666: 449-475.

PINTO HA, MELO AL (2013c). *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Planorbidae) as new intermediate hosts of the fish eyefluke *Austrodiplostomum compactum* (Trematoda: Diplostomidae) in Brazil. *Journal of Parasitology*, 99:729-733.

PINTO HA, MATI VLT, MELO AL (2014). New insights into the cycle of *Platynosomum* (Trematoda: Dicrocoelidae). *Parasitology Research*, 113: 2701-2707.

PINTO HA, CAFFARA M, FIORAVANTI ML, MELO AL (2015a). Experimental and molecular study of cercariae of *Clinostomum* sp. (Trematoda: Clinostomidae) from *Biomphalaria* spp. (Mollusca: Planorbidae) in Brazil. *Journal of Parasitology*, 101(1): 108-113.

PINTO HA, MELO AL, BRANT SV (2015b). Where are the South American freshwater turtle blood flukes (Trematoda: Spirorchiidae)? The first morphological and molecular analysis of spirorchiid cercariae from freshwater snails in Brazil. *Parasitology International*, 64: 553-558.

PINTO HA, GRIFFIN MJ, QUINIOU SM, WARE C, MELO AL (2016). *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) as an intermediate host of *Drepanocephalus* spp. (Trematoda: Echinostomatidae) in Brazil: a morphological and molecular study. *Parasitology Research*, 115: 51-62.

PINTO HA, PULIDO-MURILLO EA, MELO AL, BRANT SV (2017). Putative new genera and species of avian schistosomes potentially involved in human cercarial dermatitis in the Americas, Europe and Africa. *Acta Tropica*, 176: 415-420.

PINTO HA, GONÇALVES NQ, LÓPEZ-HERNANDEZ D, PULIDO-MURILLO EA, MELO AL (2018). The life cycle of a zoonotic parasite reassessed: Experimental infection of *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) with *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae). *PloS One*, 13 (4): 1-10.

PIRAJÁ DA SILVA MA (1912). Cercaire brésilienne (*Cercaria blanchardi*) a queue bifurquée. *Archives of Parasitology*, 15: 398-400.

PLATT TR (2002). Family Spirorchiidae Stunkard, 1921. In Gibson DI, Jones A, Bray RA (Eds), *Keys to the Trematoda I*, International and The Natural History Museum, 453-462pp.

PLOWRIGHT RK, PARRISH CR, MCCALLUM H, HUDSON PJ, KO AI, GRAHAM AL, LLOYD-SMITH (2017). Pathways to zoonotic spillover. *Nature reviews Microbiology*, 15 (8): 502-510.

POULIN RP, CRIBB TH (2002). Trematode life cycles: short is sweet? *Trends in Parasitology*, 8 (4): 176-183.

POULIN R, MORAND S (2004). *Parasite Biodiversity*. Smithsonian Books, Washington DC. 216pp.

POULIN R (2014). Parasite biodiversity revisited: frontiers and constraints. *International Journal for Parasitology*, 44: 581-589.

POULIN R, PRESSWELL B (2016). Taxonomic quality of species descriptions varies over time and with the number of authors, but unevenly among parasitic taxa). *Systematic Biology*, 65 (6): 1107–1116.

POULIN R, KAMIYA T, LARGUE C (2019) Evolution, phylogenetic distribution and functional ecology of division of labour in trematodes. *Parasites & Vectors*, 12:5, <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3241-6>.

POULIN R, PRESSWELL B, JORGE F (2020). The state of fish parasite discovery and taxonomy: a critical assessment and a look forward. *International Journal for Parasitology*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.12.009>.

PRITSCH IC, MOLENTO MB (2018). Recount of reported cases of human fascioliasis in Brazil over the last 60 years. *Revista de Patologia Tropical*, 47 (2): 75-85.

PUENTE GL (1997). Acute and subacute fasciolosis of alpacas (*Lama pacos*) and treatment with triclabendazole. *Tropical Animal Health and Production*, 29: 31–32.

PULIDO-MURILLO EA, FURTADO LFV, MELO AL, RABELO EML, PINTO HA (2018). Fishborne zoonotic trematodes transmitted by *Melanooides tuberculata* snails, Peru. *Emerging Infections Diseases*, 24 (3): 606-608.

ŘÍČAN KULLANDER O, PIÁLEK L, ALMIRÓN A, CASCIOTTA J (2011). Two new species of *Australoheros* (Teleostei: Cichlidae), with notes on diversity of the genus and biogeography of the Río de la Plata basin. *Zootaxa*, 2982: 1-26.

ROJAS D, SOTO C, ROJAS A (2013). Pathology and first report of natural eye infection with the trematode *Philophthalmus gralli* (Digenea, Philophthalmidae) in *Tinamus major* (Tinamiformes, Tinamidae), Costa Rica. *Parasitology International*, 62: 571-574.

RONQUIST F, TESLENKO M, MARK PVD, AYRES DL, DARLING A, HOHNA S, LARGET B, LIU L, SUCHARD MA, HUELSENBECK JP (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, 61 (3): 539-542.

ROSSER TG, ALBERSON NR, KHOO LH, WOODYARD ET, POTE LM, GRIFFIN MJ (2016). Characterization of the life cycle of a fish eye fluke, *Austrodiplostomum ostrowskiae* (Digenea: Diplostomidae), with notes on two other diplostomids infecting

Biomphalaria havanensis (Mollusca: Planorbidae) from catfish aquaculture ponds in Mississippi, USA. *Journal of Parasitology*, 102 (2): 260-274.

RUIZ, JM (1943). Contribuição ao estudo das formas larvárias de trematóides brasileiros. *Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo*, 3:105-112.

SAPP SGH, ALHABSHAN RN, BISHOP HS, FOX M, NDUBUISI M, SNIDER CE, BRADBURY RS (2019). Ocular trematodiasis caused by the avian eye fluke *Philophthalmus* in Southern Texas. *Open Forum Infections Diseases*. doi: 10.1093/ofid/ofz265.

SANTARÉM VA, TOSTES RA, ALBERTI H, SANCHES OC (2006). *Fasciola hepatica* in capybara. *Acta Tropica*, 98: 311-313.

SANTOS EGN, SANTOS CP (2014). Parasite-induced and parasite development-dependent alteration of the swimming behavior of fish hosts. *Acta Tropica*, 127: 56– 62.

SCHAFRANSKI L (1974). Estudo sobre o ciclo evolutivo do *Typhlocoelum cucumerinum* (Rudolphi, 1809) (Trematoda, Cyclocoelidae). *Thesis*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 57p.

SCHWANTES JB, QUEVEDO PS, D'ÁVILA MF, MOLENTO MB, GRAICHEN DAS (2019). *Fasciola hepatica* in Brazil: genetic diversity provides insights of its origin and geographic dispersion. *Journal of Helminthology*, 1–7. Disponível em; <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000774>.

SCHWEIZER G, BRAUN U, DEPLAZES P, TORGERSON PS (2005). Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record*, 157(7): 188-193.

SCHOLZ T, BESPROZVANNYKH VV, BOUTORINA TE, CHOUDHURY A, CRIBB TH, ERMOLENKO AV, FALTYNKOVÁ A, SHEDKO MB, SHIMAZU T, SMIT NJ

(2016). Trematode diversity in freshwater fishes of the Globe I: 'Old World'. *Systematic Parasitology*, 93:257–269.

SCHURER JM, MOSITES E, LI C, MESCHKE S, RABINOWITZ P (2016). Community-based surveillance of zoonotic parasites in a 'One Health' world: A systematic review. *One Health*, 2: 166-174.

SCOTT ME, RAU ME, MCLAUGHLIN D (1982). A comparison of aspects of the biology of two subspecies of *Typhlocoelum cucumerinum* (Digenea: Cyclocoelidae) in three families of snails (Physidae, Lymnaeidae and Planorbidae). *International Journal for Parasitology*, 12: 123-133.

SENG CM, SETHA T, NEALON J, SOCHEAT D, CHANTHA N, NATHAN MB (2008). Community-based use of the larvivorous fish *Poecilia reticulata* to control the dengue vector *Aedes aegypti* in domestic water storage containers in rural Cambodia. *Journal of Vector Ecology*, 33 (1): 139-144.

SERENO-URIBE AL, GARCÍA-VARELA M, PINACHO-PINACHO CD, PÉREZ-PONCE DE LEÓN (2018). Three new species of *Clinostomum* Leidy, 1856 (Trematoda) from Middle American fish-eating birds. *Parasitology Research*, 117: 2171-2185.

SERENO-URIBE AL, LÓPEZ-JIMENEZ A, ANDRADE-GÓMEZ L, GARCÍA-VARELA M (2019). A morphological and molecular study of adults and metacercariae of *Hysteromorpha triloba* (Rudolphi, 1819), Lutz 1931 (Diplostomidae) from the Neotropical region. *Journal of Helminthology*, 93: 91–99.

SEPPÄLÄ O, KARVONEN A, VALTONEN ET (2004). Parasite-induced change in host behaviour and susceptibility to predation in an eye fluke – fish interaction. *Animal Behavior*, 68: 257-263.

SEPPÄLÄ O, KARVONEN A, VALTONEN ET (2006). Susceptibility of eye fluke-infected fish to predation by bird hosts. *Parasitology*, 132: 575–579.

SEPPÄLÄ O, KARVONEN A, VALTONEN ET (2011). Eye fluke-induced cataracts in natural fish populations: is there potential for host manipulation? *Parasitology*, 138: 209–214.

SERRA-FREIRE NM, NUERNBERG S (1992). Geopolitical dispersion of the occurrence of *Fasciola hepatica* in the state of Santa Catarina, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87 (1): 263-269.

SHCHENKOV SV, DENISOVA SA, KREMNEV GA, DOBROVOLSKIJ AA (2019). Five new morphological types of virgulate and microcotylous xiphidiocercariae based on morphological and molecular phylogenetic analyses. *Journal of Helminthology*, 1-12. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000853>.

SILVA MAP (1912). Cercaire brésilienne (*Cercaria blanchardi*) a queue bifurquée. *Archives of Parasitology*, 15: 398-400.

SILVA-SANTOS IC, SCAINI CJ, RODRIGUES LAF (1992). *Myocastor coypus* (Rodentia: Capromyidae) como reservatório silvestre de *Fasciola hepatica* (Lineu,1758). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 1 (1): 27-30.

SIMONE L (2006). *Land and Freshwater mollusks of Brazil*. Ed. FAPESP. São Paulo, 390pp.

SMITH SJ, HICKMAN JL (1983). Two strigeiod trematodes, *Apatemon* (*Apatemon*) *gracilis* (Rudolphi, 1819) and *Diplostomum* (*Dolichorchis*) *galaxim* n.sp. which encyst in the freshwater fish *Galaxias auratus* Johnston in lake crescent, Tasmania. *Papers and proceedings of the Royal Society of Tasmania*, 117: 21-39.

SINKOC AL, BRUM FA, MÜLLER G, BRUM JGW (2004). Helmintos parasitos de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris* L. 1766) na região de Araçatuba, São Paulo, Brasil. *Arquivos do Instituto de Biologia*, 71 (3): 329-333.

SINKOC AL, BRUM JGW, MULLER G (2009). Gastrintestinal helminths of capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*, Linnaeus, 1766) in cattle breeding farm in the area of the

Ecological Reserve of Taim, Rio Grande. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52: 327–333.

SITKO J, BIZOS J, HENEGER P (2017). Central European parasitic flatworms of the Cyclocoelidae Stossich, 1902 (Trematoda: Plagiorchiida): molecular and comparative morphological analysis suggests the reclassification of *Cyclocoelum obscurum* (Leidy, 1887) into the *Harrahium* Witenberg, 1926. *Parasitology*, 144(4): 368-383.

SOARES MP, SILVA SS, NIZOLI LQ, FELIX SR, SCHILD AL (2007). Chronic fascioliasis in farmed and wild greater rheas (*Rhea americana*). *Veterinary Parasitology*, 145: 168–171.

SOLDÁNOVÁ M, GEORGIEVA S, ROHÁČOVÁ J, KNUDSEN R, KUHN JA, HENRIKSEN EH, SCHOLZ T (2017). Molecular analyses reveal high species diversity of trematodes in a sub-Arctic lake. *International Journal for Parasitology*, 47: 327-345.

SOULSBY EJL (1982). *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*. Baillière Tindall, London, 7: 809p.

SPATZ L, CAPPA SMG, OSTROWSKI DE NÚÑEZ M (2012). Susceptibility of wild populations of *Biomphalaria* spp. from neotropical South America to *Schistosoma mansoni* and interference of *Zygocotyle lunata*. *Journal of Parasitology*, 98 (6): 1291-1295.

SPITHILL TW, PIEDRAFITA D, SMOOKER PM (1997). Immunological approaches for the control of fasciolosis. *International Journal for Parasitology*, 27(10): 1221-1235.

SULLIVAN JT, CHENG TC, HOWLAND KH (1985). Studies on parasitic castration: Castration of *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca: Gastropoda) by several marine trematodes. *Transactions of the American Microscopical Society*, 104 (2): 154-171.

SUTTON CA, OSTROWSKI DE NÚÑEZ M, LUNASCHI LI, ALLEKOTTE R (1997). Los digeneos Notocotyloidea de *Hydrochaeris* Linne (Rodentia) de Argentina. *Gayana Zoologica*, 61 (1): 23-31.

SWENNEN C, HEESSEN HJL, HOCKER WM (1979). Occurrence and biology of the trematodes *Cotylurus (Ichthyocotylurus) erraticus*, *C. (I.) variegatus* and *C. (I.) platycephalus* (Digenea: Strigeidae) in the Netherlands. *Netherlands Journal of Sea Research*, 13 (2): 161-191.

SZIDAT L (1969). Structure, development, and behaviour of new strigeatoid metacercariae from subtropical fishes of South America. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 26 (4): 753-786.

TAGLIORETTI V, ROSSIN MA, TIMI JT (2018). Fish-trematode systems as indicators of anthropogenic disturbance: Effects of urbanization on a small stream. *Ecological Indicators*, 93: 759-770.

TAKEMOTO RM, LIZAMA MLAP., GUIDELLI GM, PAVANELLI GC (2004). Parasitas de peixes de águas continentais. In Ranzani-Paiva MJT, Takemoto RM, LIZAMA MLAP (Eds.). *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Livraria Varela. 426 pp.

THOMPSON RCA, POLLEY L (2014). Parasitology and One Health. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3: A1-A2.

TORCHIN ME, BYERS JE, HUSPENI TC (2005). Differential parasitism of native and introduced snails: replacement of a parasite fauna. *Biological Invasions*, 7: 885-894.

TKACH VV, PAWLOWSKI J, MARIAUX J, SWIDERSKI Z (2000). Molecular phylogeny of the suborder Plagiorchiata and its position in the system of Digenea- Chapter 17. *International Journal for Parasitology*, 30 (1): 186-193.

TKACH VV, LITTLEWOOD TJ, OLSON PD, KINSELLA M, SWIDERSKI Z (2003). Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda:

Digenea). *Systematic Parasitology*, 56: 1-15.

TKACH VV, KUDLAI O, KOSTADINOVA A (2016). Molecular phylogeny and systematics of the Echinostomatoidea Looss, 1899 (Platyhelminthes: Digenea). *International Journal for Parasitology*. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.11.001>.

TRAVASSOS L (1922). Informações sobre a fauna helminthologica de Matto Grosso. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 309-354.

TRAVASSOS L (1950). Introdução ao Estudo da Helmintologia. *Revista Brasileira de Biologia*. Rio de Janeiro, 173pp.

TRAVASSOS L, FREITAS JFT, KHON A (1969). *Trematódeos do Brasil*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 67 (1): 886p.

UENO H, GUTIERRES VC, MATTOS MJT, MULLER G (1982). Fascioliasis problems in ruminants in Rio Grande do Sul, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 11 (2-3): 185-219.

UETA MT (1980). Laboratory infection of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea columella*. *Revista de Saúde Pública*, 14 (1): 43-57.

VAN STEENKISTE N, LOCKE SA, CASTELIN M, MARCOGLIESE DJ, ABBOTT CL (2015). New primers for DNA barcoding of digeneans and cestodes (Platyhelminthes). *Molecular Ecology Resources*, 15: 945-952.

VÉLEZ J, HIRZMANN J, LANGE MK, CHAPARRO-GUTIÉRREZ JJ, TAUBERT A, HERMOSILLA C (2018). Occurrence of endoparasites in wild Antillean manatees (*Trichechus manatus manatus*) in Colombia. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 7 (1): 54-57.

VERDADE LM, FERRAZ KMPMB (2006). Capybaras in an anthropogenic habitat in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 66 (1B): 371-378.

VEROCAI GG, LOPES LN, BURLINI L, CORREIA TR, SOUZA CP, COUMENDOUROS K (2009). Occurrence of *Philophthalmus gralli* (Trematoda: Philophthalmidae) in farmed ostriches in Brazil. ***Tropical Animal Health and Production***, 41: 1241-1242.

VIANNA RT, JÚNIOR JP, BRANDÃO DA (2003). *Clinostomum complanatum* (Digenea: Clinostomidae) density in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae). ***Brazilian Archives of Biology and Technology***, 48 (4): 635-642.

VICENTE JJ, SANTOS ES, SOUZA SV (1978). Helminths of fishes of Amazonian rivers of the Coleção do Instituto Oswaldo Cruz. I. Trematoda. ***Atas Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro***, 25: 9-16.

VILAS R, CRISCIONE CD, BLOUIN MS (2005). A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. ***Parasitology***, 131: 839-846.

VOGE M, JEONG K (1971). Growth *in vitro* of *Cotylurus lutzi* Basch 1969 (Trematoda: Strigeidae), from Tetracotyle to patent adult. ***International Journal for Parasitology***, 1: 139-143.

WAIKAGUL J, DEKUMYOY P, YOONUANTA, PRAEVANIT R (2006). Conjunctiva Philophthalmosis: a case report in Thailand. ***The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene***, 74 (5): 848-849.

WEIBLEN AM, BRANDÃO DA (1992). Levantamento parasitológico em *Hoplais malabaricus*, Bloch (1794) (traíra) de águas da região de Santa Maria- RS. ***Ciência Rural, Santa Maria***, 22 (2): 203-206.

WEINSTEIN SB, KURIS AM (2016). Independent origins of parasitism in Animalia. ***Biology Letters***, 12: 20160324. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2016.0324>.

WERNECK MR, BECKER JH, GALLO BG, SILVA RJ (2006). *Learedius learedi* Price 1934 (Digenea, Spirorchiidae) in *Chelonia mydas* Linnaeus 1758 (Testudines,

Chelonidae) in Brazil: case report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58: 550-555.

WILL KW, MISHLER BD, WHEELER QD (2005). The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54 (5): 844-851.

WILLEY CH (1941). The life history and bionomics of the trematode, *Zygocotyle lunata* (Paramphistomidae). *Zoologica*, 26: 65–92.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2005). Combating Emerging Infectious Diseases in the South East Asia Region. *Regional Office for South-East Asia*, 46pp.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2006). *WHO Consultation to develop a strategy to estimate the global burden of foodborne diseases*. Geneva, 56pp.

YAMAGUTI S, 1971. *Synopsis of the digenetic trematodes of vertebrates*. Keigaku Publishing Company, Tokyo, 1074 pp.

YAMAGUTI S, 1975. *A synoptical review of life histories of digenetic trematodes of vertebrates with special reference to the morphology of their larval forms*. Keigaku Publishing, Tokyo. 590 pp.

YAZWINSKI TA, JOHNSON Z, NORTON RA (1992). Efficacy of febendazole against naturally acquired *Raillietina cesticillus* infections of chickens. *Avian Pathology*, 21: 327–331.

APÊNDICE 1

Informações sobre sequências utilizadas para análise molecular.

Quadro 1- Apêndice 1. Identificação de sequências da família Clinostomidae utilizadas para análise molecular no presente estudo

Marcador Ribossomal 28S						
Espécie	Família	Forma	Hospedeiro	Localidade	Código GB	Referência
<i>Clinostomum album</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea alba</i>	EUA	KU708008	Rosser et al., 2017
<i>Clinostomum brieni</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Heteropneustes fossilis</i>	Índia	KF781299	Athokpam et al., 2014
<i>Clinostomum complanatum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Squalius cephalus</i>	Itália	MK811210	Locke et al., 2019
<i>Clinostomum complanatum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Barbus barbus</i>	Itália	FJ609420	Gustinelli et al., 2010
<i>Clinostomum cutaneum</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea cinerea</i>	Quênia	GQ339114	Gustinelli et al., 2010
<i>Clinostomum marginatum</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea alba</i>	México	MF398323	Hernandez-Mena et al., 2017
<i>Clinostomum marginatum</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea alba</i>	EUA	KU708007	Rosser et al., 2017
<i>Clinostomum phalacrocoracis</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea cinerea</i>	Quênia	FJ609423	Gustinelli et al., 2010
<i>Clinostomum poteae</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Nannopterum auritus</i>	EUA	MH282569	Rosser et al., 2016
<i>Clinostomum poteae</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Nannopterum auritus</i>	EUA	MH282568	Rosser et al., 2016
<i>Clinostomum</i> sp.	Clinostomidae	Metacercária	<i>Rhamdia</i> sp.	México	MH159735	Briosio-Aguilar et al., 2018
<i>Clinostomum</i> sp.	Clinostomidae	Adulto	<i>Cochlearius cochlearius</i>	México	MH159727	Briosio-Aguilar et al., 2018
<i>Clinostomum tataxumui</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea alba</i>	México	MF398321	Hernandez-Mena et al., 2017
<i>Clinostomum tataxumui</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea alba</i>	México	MF398320	Hernandez-Mena et al., 2017
<i>Ithyoclinostomum yamagutii</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Alligator mississippiensis</i>	EUA	MN696162	Rosser et al., 2020
<i>Ithyoclinostomum yamagutii</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea herodias</i>	EUA	MN696160	Rosser et al., 2020
<i>Odhneriotrema incommodum</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea herodias</i>	EUA	MN696161	Rosser et al., 2020
<i>Odhneriotrema incommodum</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Alligator mississippiensis</i>	EUA	MF765998	Woodyard et al., 2017
(GE) <i>Austrodiplostomum compactum</i>	Diplostomidae	Adulto	<i>Nannopterum brasiliensis</i>	México	MH373586	Sereno-Urbe et al., 2019

Quadro 2- Apêndice 1. Identificação de sequências da família Clinostomidae utilizadas para análise molecular no presente estudo

Marcador Ribossomal ITS						
Espécie	Família	Forma	Hospedeiro	Localidade	Código GB	Referência
<i>Clinostomum album</i>	Clinostomidae	Cercária	<i>Planorbella trivolvis</i>	EUA	MH282566	Rosser et al., 2018
<i>Clinostomum arquus</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Heterandria jonesii</i>	México	KJ477587	Sereno-Uribe, 2018
<i>Clinostomum arquus</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Profundulus</i> sp.	México	KJ477664	Sereno-Uribe, 2018
<i>Clinostomum arquus</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Egretta thula</i>	México	KU156759	Sereno-Uribe, 2018
<i>Clinostomum attenuatum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Lithobates</i> sp.	EUA	KP150307	Locke et al., 2015
<i>Clinostomomum caffarae</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea alba</i>	México	KU156758	Sereno-Uribe, 2018
<i>Clinostomomum caffarae</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea alba</i>	México	KU156760	Sereno-Uribe, 2018
<i>Clinostomomum caffarae</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea alba</i>	México	KU156761	Sereno-Uribe, 2018
<i>Clinostomum cichlidorum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Archocentrus siquia</i>	Costa Rica	KU156772	Perez-Ponce de Leon et al., 2016
<i>Clinostomum cichlidorum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Archocentrus siquia</i>	Costa Rica	KU156773	Perez-Ponce de Leon et al., 2016
<i>Clinostomum cichlidorum</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Cochlearius cochlearis</i>	México	KJ477670	Sereno-Uribe 2018
<i>Clinostomum detruncatum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Synbranchus marmoratus</i>	Brasil	KP110566	Locke et al., 2015
<i>Clinostomum heluans</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Cichlasoma boliviense</i>	Bolívia	KP110577	Locke et al., 2019
<i>Clinostomum heluans</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Australoheros</i> sp.	Brasil	MH159770	Briosio-Aguilar, 2018
<i>Clinostomum marginatum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Menidia beryllina</i>	EUA	MH282555	Rosser et al., 2018
<i>Clinostomum marginatum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Eurycea tonkawae</i>	EUA	MH042927	McAllister et al., 2018
<i>Clinostomum</i> sp.	Clinostomidae	Metacercária	<i>Poecilia reticulata</i>	Brasil	KJ789384	Pinto et al., 2015
<i>Clinostomum</i> sp.	Clinostomidae	Cercária	<i>Biomphalaria</i> spp.	Brasil	KJ789387	Pinto et al., 2015
<i>Clinostomum</i> sp.	Clinostomidae	Metacercária	<i>Apistogamma</i> sp.	Peru	KP110574	Locke et al., 2015
<i>Clinostomum</i> sp. 1	Clinostomidae	Metacercária	<i>Rhamdia</i> sp.	México	KU156743	Sereno Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum</i> sp. 1	Clinostomidae	Metacercária	<i>Rhamdia</i> sp.	Honduras	KU156763	Sereno Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum</i> sp. 1	Clinostomidae	Metacercária	<i>Rhamdia</i> sp.	Honduras	KU156766	Sereno Uribe et al., 2018

Continuação

Família Clinostomidae- Marcador Ribossomal ITS						
Espécie	Família	Forma	Hospedeiro	Localidade	Código GB	Referência
<i>Clinostomum</i> sp. 3	Clinostomidae	Metacercária	<i>Rhamdia</i> sp.	Honduras	KU156767	Sereno Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum</i> sp. 3	Clinostomidae	Metacercária	<i>Gobiomorus maculatus</i>	Costa Rica	KJ477597	Sereno Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum</i> sp. 3	Clinostomidae	Metacercária	<i>Rhamdia rogersi</i>	Costa Rica	KU156774	Sereno Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum tataxumui</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Dormitator latifrons</i>	México	KJ477673	Perez Ponce de León et al., 2016
<i>Clinostomum tataxumui</i>	Clinostomidae	-	-	México	KP110592	Locke et al., 2015
<i>Clinostomum tataxumui</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Tigrisoma mexicanum</i>	México	KU156742	Perez Ponce de León et al., 2016
<i>Clinostomum tataxumui</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Tigrisoma mexicanuma</i>	México	KJ477675	Perez Ponce de León et al., 2016
<i>Euclinostomum heterostomum</i>	Clinostomidae	Metacercária	Ciclídeo	Israel	KP721439	Caffara et al., 2016
<i>Euclinostomum heterostomum</i>	Clinostomidae	Metacercária	Ciclídeo	Israel	KP721426	Caffara et al., 2016
<i>Ithyoclinostomum</i> sp.	Clinostomidae	Metacercária	<i>Herichthys deppii</i>	México	MH159769	Briosio-Aguilar et al., 2018
<i>Ithyoclinostomum</i> sp.	Clinostomidae	Metacercária	<i>Herichthys deppii</i>	México	MH159768	Briosio-Aguilar et al., 2018
<i>Ithyoclinostomum yamagutii</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea herodias</i>	EUA	MN696162	Rosser et al., 2020
<i>Ithyoclinostomum yamagutii</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea herodias</i>	EUA	MN696159	Rosser et al., 2020
<i>Odhneriotrema incommodum</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Alligator mississippiensis</i>	EUA	MF765998	Woodyard et al., 2017
<i>Odhneriotrema incommodum</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Alligator mississippiensis</i>	EUA	MF766000	Woodyard et al., 2017
(GE) <i>Austrodiplostomum compactum</i>	Diplostomidae	Metacercária	<i>Oreochromis niloticus</i>	Brasil	MN179270	López-Hernández, 2019

Quadro 3- Apêndice 1. Identificação de sequências da família Clinostomidae utilizadas para análise molecular no presente estudo

Gênero <i>Clinostomum</i> - Marcador Mitochondrial COI						
Espécie	Família	Forma	Hospedeiro	Localidade	Código GB	Referência
<i>Clinostomum marginatum</i>	Clinostomidae	Metacéraria	<i>Anaxyrus boreas</i>	EUA	MK426663	Calhoun et al., 2019
<i>Clinostomum marginatum</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea alba</i>	EUA	KU708009	Rosser et al., 2017
<i>Clinostomum</i> sp.	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea cocoi</i>	Argentina	MH748705	Não publicado
<i>Clinostomum</i> sp.	Clinostomidae	Metacéraria	<i>Crenicichla vittata</i>	Argentina	MF673558	Não publicado
<i>Clinostomum</i> sp.	Clinostomidae	Metacéraria	<i>Cichlasoma boliviense</i>	Bolívia	KP110533	Locke et al., 2015
<i>Clinostomum</i> sp. 1	Clinostomidae	Metacéraria	<i>Rhamdia</i> sp.	México	KU156782	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum</i> sp. 1	Clinostomidae	Metacéraria	<i>Rhamdia</i> sp.	Honduras	KU156804	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum</i> sp. 1	Clinostomidae	Metacéraria	<i>Rhamdia</i> sp.	Honduras	KU156806	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum</i> sp. 3	Clinostomidae	Metacéraria	<i>Rhamdia</i> sp.	Honduras	KU156807	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum</i> sp. 3	Clinostomidae	Metacéraria	<i>Gobiomorus maculatus</i>	Costa Rica	KJ477474	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum</i> sp. 3	Clinostomidae	Metacéraria	<i>Rhamdia guatemalensis</i>	México	KJ477443	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum tataxumui</i>	Clinostomidae	-	-	México	KP110545	Locke et al., 2015
<i>Clinostomum tataxumui</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Tigrisoma mexicanum</i>	México	KJ504192	Perez-Ponce de León, 2016
(GE) <i>Austrodiplostomum compactum</i>	Diplostomidae	Metacéraria	<i>Oreochromis niloticus</i>	Brasil	MN179321	López-Hernández et al., 2019

continuação

Gênero <i>Clinostomum</i> - Marcador Mitocondrial COI						
Espécie	Família	Forma	Hospedeiro	Localidade	Código GB	Referência
<i>Clinostomum album</i>	Clinostomidae	Cercária	<i>Planorbella trivolvis</i>	EUA	MH282549	Rosser et al., 2018
<i>Clinostomum album</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Pimephales promelas</i>	EUA	MH282539	Rosser et al., 2018
<i>Clinostomum arqquus</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Pseudoxiphophorus jonesii</i>	México	KJ477560	Sereno Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum arqquus</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Egretta thula</i>	México	KJ504184	Sereno Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum arqquus</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Egretta thula</i>	México	KU156800	Perez Ponce de León et al., 2016
<i>Clinostomum attenuatum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Lithobates</i> sp.	EUA	KP150306	Locke et al., 2015
<i>Clinostomum attenuatum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Lithobates</i> sp.	EUA	KP150305	Locke et al., 2015
<i>Clinostomum caffarae</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea alba/Egretta thula</i>	México	KU156797	Sereno Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum caffarae</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea alba/Egretta thula</i>	México	KU156803	Sereno Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum caffarae</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Astyanax aeneus</i>	México	KU156788	Perez Ponce de León et al., 2016
<i>Clinostomum cichlidorum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Herichthys cyanoguttatus</i>	México	KJ477466	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum cichlidorum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Costa Rica	KU156813	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum cichlidorum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Cichlasoma trimaculatum</i>	México	KJ504194	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum cichlidorum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Archocentrus siquia</i>	Costa Rica	KU156818	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum cichlidorum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Parachromis managuensis</i>	Costa Rica	KU156811	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum cichlidorum</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Tigrisoma mexicanum</i>	México	KJ504203	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Clinostomum detruncatum</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Synbranchus marmoratus</i>	Brasil	KP110518	Locke et al., 2015
<i>Clinostomum heluans</i>	Clinostomidae	Adulto	<i>Ardea alba</i>	México	MG860853	Briosio-Aguilar et al., 2018
<i>Clinostomum heluans</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Australoheros</i> sp.	Brasil	MG860852	Briosio-Aguilar et al., 2018

Quadro 4- Apêndice 1. Identificação de sequências Família Diplostomidae e Strigeidae utilizadas para análise molecular no presente estudo

Marcador Ribossomal ITS						
Espécie	Família	Forma	Hospedeiro	Localidade	Código GB	Referência
<i>Austrodiplostomum compactum</i>	Diplostomidae	Metacercária	<i>Astatheros alfari</i>	Costa Rica	MH373575	Sereno-Uribe et al., 2019
<i>Austrodiplostomum compactum</i>	Diplostomidae	Metacercária	<i>Oreochromis niloticus</i>	Brasil	MN179270	Lopez-Hernandez et al., 2019
<i>Austrodiplostomum mordax</i>	Diplostomidae	Metacercária	<i>Odontesthes bonariensis</i>	Argentina	MH373579	Sereno-Uribe et al., 2019
<i>Austrodiplostomum mordax</i>	Diplostomidae	Metacercária	<i>Odontesthes bonariensis</i>	Argentina	MH373581	Sereno-Uribe et al., 2019
<i>Austrodiplostomum</i> sp. 1	Diplostomidae	Metacercária	<i>Herichthys cyanoguttatus</i>	EUA	MH373565	Sereno-Uribe et al., 2019
<i>Austrodiplostomum</i> sp. 2	Diplostomidae	Metacercária	<i>Gambusia affinis</i>	México	MH373570	Sereno-Uribe et al., 2019
Crassiphialinae gen. sp.	Diplostomidae	Cercária	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil	MN179277	López-Hernández et al., 2019
<i>Cotylurus gallinulae</i>	Strigeidae	Adulto	<i>Aythya affinis</i>	México	JX977841	Hernandez-Mena et al., 2014
<i>Cotylurus marcogliesei</i>	Strigeidae	Adulto	<i>Lophodytes cucullatus</i>	Canadá	MH521248	Locke et al., 2018
<i>Cotylurus</i> sp.	Strigeidae	Metacercária	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil	MN179271	López-Hernández et al., 2019
<i>Cotylurus</i> sp.	Strigeidae	Cercária	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil	MN179272	López-Hernández et al., 2019
<i>Diplostomidae</i> sp. 1	Diplostomidae	Cercária	<i>Biomphalaria obstructa</i> *	EUA	KT728779	Rosser et al., 2016
<i>Diplostomidae</i> sp. 2	Diplostomidae	Cercária	<i>Biomphalaria obstructa</i> *	EUA	KT728773	Rosser et al., 2016
<i>Hysteromorpha</i> sp.	Diplostomidae	Cercária	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil	MN179276	López-Hernández et al., 2019
<i>Hysteromorpha</i> sp.	Diplostomidae	Cercária	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil	MN179274	López-Hernández et al., 2019
<i>Hysteromorpha corti</i>	Diplostomidae	Metacercária	<i>Astyanax mexicanus</i>	Mexico	MG649490	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Hysteromorpha corti</i>	Diplostomidae	Metacercária	-	Canadá	JF769486	Locke et al., 2011
<i>Hysteromorpha corti</i>	Diplostomidae	Metacercária	<i>Catostomus commersonii</i>	Canadá	HM064926	Locke et al., 2011
<i>Hysteromorpha triloba</i>	Diplostomidae	Metacercária	<i>Squalius cephalus</i>	Itália	MH521250	Locke et al., 2018 ou 2019
<i>Tylodelphys aztecaae</i>	Diplostomidae	Adulto	<i>Tachybaptus dominicus</i>	México	MK177839	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Tylodelphys cerebralis</i>	Diplostomidae	Metacercária	<i>Channa punctata</i>	India	KX817188	Chaudhary et al., 2017
<i>Tylodelphys clavata</i>	Diplostomidae	Metacercária	<i>Coregonus lavaretus</i>	Alemanha	JQ665459	Behrmann-Godel, 2013
<i>Tylodelphys immer</i>	Diplostomidae	Adulto	<i>Gavia immer</i>	Canadá	MH521252	Locke et al., 2018
<i>Tylodelphys mashonensis</i>	Diplostomidae	Adulto	<i>Egretta alba</i>	Tanzânia	KR863384	Chibwana et al., 2015
<i>Tylodelphys</i> sp.	Diplostomidae	Metacercária	<i>Chiostoma humboldtianum</i>	México	MK177841	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Tylodelphys</i> sp.	Diplostomidae	Metacercária	<i>Gambusia</i> sp.	México	MK177845	Sereno-Uribe et al., 2018
<i>Uvulifer</i> sp.	Diplostomidae	Adulto	<i>Megaceryle alcyon</i>	México	MF568631	Lopez-Jimenez et al., 2017
<i>Uvulifer spinatus</i>	Diplostomidae	Metacercária	<i>Poecilia sphenops</i>	México	MF568609	Lopez-Jimenez et al., 2017
<i>Uvulifer spinatus</i>	Diplostomidae	Adulto	<i>Chloroceryle americana</i>	México	MF568632	Lopez-Jimenez et al., 2017
(GE) <i>Clinostomum heluans</i>	Clinostomidae	Metacercária	<i>Australoheros</i> sp.	Brasil	MH159770	Briosio-Aguilar et al., 2018

*Informação do hospedeiro no Genbank distinto do informado na publicação (*Biomphalaria havanensis*). (–) Não mencionado. (GB): Genbank. (GE) Grupo externo.

Quadro 5- Apêndice 1. Identificação de sequências da Superfamília Echinostomatoidea utilizadas para análise molecular no presente estudo

Marcador Ribossomal 28S						
Espécie	Família	Forma	Hospedeiro	Localidade	Código GB	Referência
<i>Cyclocoelum mutabile</i>	Cyclocoelidae	Adulto	<i>Calidris canutus</i>	Escócia	AY222249	Olson et al., 2003
<i>Echinoparyphium ellisi</i>	Echinostomatidae	Adulto	<i>Anas platyrhynchos</i>	Nova Zelândia	KY436410	Georgieva et al., 2017
<i>Echinostoma caproni</i>	Echinostomatidae	Cercária	<i>Biomphalaria</i>	Quênia	MK482501	Laidemitt et al., 2019
<i>Echinostoma paraensei</i>	Echinostomatidae	Adulto	Hamster	EUA	EU025867	Lotfy et al., 2008
<i>Echinostoma revolutum</i>	Echinostomatidae	Adulto	<i>Mesocricetus auratus</i>	Reino Unido	AY222246	Olson et al., 2003
<i>Fasciola gigantica</i>	Fasciolidae	Adulto	Bovino	Vietnã	MF099787	Não publicado
<i>Fasciola hepatica</i>	Fasciolidae	Adulto	Bovino	Austrália	MF099788	Não publicado
<i>Fasciola jacksoni</i>	Fasciolidae	Adulto	Elefante	Sri Lanka	MF099789	Não publicado
<i>Neohaematotrepheus arayae</i>	Cyclocoelidae	Adulto	<i>Jacana spinosa</i>	México	MH725787	López-Jimenez, 2018
<i>Parafasciolopsis fasciolaemorpha</i>	Fasciolidae	Adulto	<i>Bison bonasus</i>	Polônia	EU025869	Lotfy et al., 2008
<i>Philophthalmus gralli</i>	Philophthalmidae	Cercária	<i>Melanoides</i>	EUA	JQ246434	Church et al., 2013
<i>Philophthalmus gralli</i>	Philophthalmidae	Adulto	<i>Tachuris rubrigastra</i>	Peru	JQ627832	Literak et al., 2013
<i>Sphaeridiotrema monorchis</i>	Psilostomidae	Cercária	<i>Parafossarulus</i>	Vietnã	JQ890544	Besprozvannykh et al., 2013
<i>Tracheophilus cymbius</i>	Cyclocoelidae	Adulto	<i>Cairina moschata</i>	China	MK327367	Não publicado
<i>Typhlocoelum</i> sp.	Cyclocoelidae	Adulto	<i>Anas platyrhynchos</i>	EUA	KT956960	Tkach, 2015
(GE) <i>Centrocestus formosanus</i>	Heterophyidae	Adulto	Rato	Vietnã	KY075665	Não publicado

Quadro 6- Apêndice 1. Identificação de sequências da Superfamília Echinostomatoidea utilizadas para análise molecular no presente estudo

Marcador mitocondrial Nad-1						
Cyclocoelidae						
Espécie	Família	Forma	Hospedeiro	Localidade	Código GB	Referência
<i>Cyclocoelum mutabile</i>	Cyclocoelidae	Adulto	<i>Fulica atra</i>	Peru	MH091809	Gomez-Puerta et al., 2018
<i>Cyclocoelum mutabile</i>	Cyclocoelidae	Adulto	<i>Fulica atra</i>	Peru	MH091808	Gomez-Puerta et al., 2018
<i>Cyclocoelum mutabile</i>	Cyclocoelidae	Adulto	<i>Fulica atra</i>	República Tcheca	KU877891	Sitko et al., 2017
<i>Cyclocoelum mutabile</i>	Cyclocoelidae	Adulto	<i>Fulica atra</i>	República Tcheca	KX097823	Sitko et al., 2017
<i>Hyptiasmus oculeus</i>	Cyclocoelidae	Adulto	<i>Fulica atra</i>	República Tcheca	KU877896	Sitko et al., 2017
<i>Harrarium tringae</i>	Cyclocoelidae	Adulto	<i>Tringa erythropus</i>	República Tcheca	KU877898	Sitko et al., 2017
<i>Harrarium obscurum</i>	Cyclocoelidae	Adulto	<i>Tringa nebularia</i>	República Tcheca	KU877897	Sitko et al., 2017
<i>Morishitium polonicum</i>	Cyclocoelidae	Adulto	<i>Turdus philomelos</i>	República Tcheca	KU877893	Sitko et al., 2017
<i>Tracheophilus cymbius</i>	Cyclocoelidae	Adulto	Pato	China	MK355447	Li et al., 2020
<i>Tracheophilus cymbius</i>	Cyclocoelidae	Adulto	Pato	China	NC044135	Não publicado
<i>Uvitellina</i> sp.	Cyclocoeliidae	Adulto	<i>Vanellus indicus</i>	Paquistão	NC042722	Suleman et al., 2019
Echinostomatidae						
<i>Echinostoma paraensei</i>	Echinostomatidae	-	-	Brasil	AF025834	Morgan e Blair, 1997
<i>Echinostoma revolutum</i>	Echinostomatidae	Cercária	<i>Lymnaea peregrina</i>	Bulgária	AY168933	Kostadinova 2003
<i>Echinostoma revolutum</i>	Echinostomatidae	Cercária	<i>Stagnicola palustris</i>	Alemanha	KC618454	Georgieva et al., 2013
<i>Echinostoma robustum</i>	Echinostomatidae	Adulto	<i>Gallus gallus</i> (exp)	Brasil	GQ463055	Detwiler et al., 2010
<i>Echinostoma trivolvis</i>	Echinostomatidae	Adulto	<i>Ondatra zibethicus</i>	EUA	JQ670850	Detwiler et al., 2012
<i>Echinostoma trivolvis</i>	Echinostomatidae	Cercária	<i>Planorbella trivolvis</i>	Canadá	MH369218	Gordy et al., 2019

Quadro 7- Apêndice 1. Identificação de sequências da Superfamília Echinostomatoidea utilizadas para análise molecular no presente estudo

Marcador mitocondrial Nad-1						
Fasciolidae						
Espécie	Família	Forma	Hospedeiro	Localidade	Código GB	Referência
<i>Fasciolopsis buski</i>	Fasciolidae	Adulto	Suíno	China	NC030528	Ma et al., 2017
<i>Fasciola gigantica</i>	Fasciolidae	Adulto	Ovelha	Armênia	MG972404	Aghayan et al., 2019
<i>Fasciola gigantica</i>	Fasciolidae	Adulto	Ovelha	Armênia	MG972405	Aghayan et al., 2019
<i>Fasciola hepatica</i>	Fasciolidae	Adulto	<i>Hippocamelus antisensis</i>	Peru	MH681801	Gomez-Puerta et al., 2019
<i>Fasciola hepatica</i>	Fasciolidae	Adulto	Bovino	Armênia	MG972400	Aghayan et al., 2019
<i>Fasciola hepatica</i>	Fasciolidae	Adulto	Bovino	Irã	MK468848	Não publicado
<i>Fasciola hepatica</i>	Fasciolidae	Adulto	Bison sp.	Polônia	KR422394	Não publicado
<i>Fasciola hepatica</i>	Fasciolidae	Adulto	<i>Hydrochoerus</i>	Brasil	MF287675	Labruna et al., 2017
<i>Fasciola hepatica</i>	Fasciolidae	Adulto	<i>Bos taurus</i>	Equador	LC273114	Não publicado
<i>Fasciola hepatica</i>	Fasciolidae	Adulto	Bovino	Brasil	MK838742	Schwantes et al., 2019
<i>Fasciola hepatica</i>	Fasciolidae	Adulto	Bovino	Brasil	MK838706	Schwantes et al., 2019
<i>Fasciola hepatica</i>	Fasciolidae	Adulto	Bovino	Brasil	MK838702	Schwantes et al., 2019
<i>Fasciola hepatica</i>	Fasciolidae	Adulto	<i>Bos taurus</i>	Argentina	MF959490	Não publicado
<i>Fasciola hepatica</i>	Fasciolidae	Adulto	<i>Bos taurus</i>	Uruguai	AB207154	Itagaki et al., 2005
<i>Fasciola jacksoni</i>	Fasciolidae	Adulto	<i>Elephas maximus</i>	Sri Lanka	KX787886	Rajapakse et al., 2019
<i>Fascioloides magna</i>	Fasciolidae	-	-	-	KU060148	Não publicado
<i>Fascioloides magna</i>	Fasciolidae	-	-	-	NC029481	Não publicado
<i>Parafasciolopsis fasciolaemorpha</i>	Fasciolidae	Adulto	Bisão	Polônia	EF612500	Lotfy et al., 2008

Quadro 8- Apêndice 1. Identificação de sequências da Superfamília Echinostomatoidea utilizadas para análise molecular no presente estudo

Marcador mitocondrial Nad-1						
Philophthalmidae						
Espécie	Família	Forma	Hospedeiro	Localidade	Código GB	Referência
<i>Philophthalmus gralli</i>	Philophthalmidae	Adulto	<i>Rhea americana</i>	EUA	Não publicado	Church et al., 2013.
<i>Philophthalmus gralli</i>	Philophthalmidae	Cercária	<i>Melanoides tuberculata</i>	Costa Rica	KF986207	Henerberg et al., 2014
<i>Philophthalmus gralli</i>	Philophthalmidae	Cercária	<i>Melanoides tuberculata</i>	Costa Rica	KF986213	Henerberg et al., 2014
<i>Philophthalmus lacrymosus</i>	Philophthalmidae	Adulto	<i>Larus fuscus</i>	Portugal	MG029437	Henerberg et al., 2018
<i>Philophthalmus lacrymosus</i>	Philophthalmidae	Adulto	<i>Larus fuscus</i>	Portugal	MG029436	Henerberg et al., 2018
<i>Philophthalmus lucipetus</i>	Philophthalmidae	Adulto	<i>Larus michaelis</i>	Portugal	MG029434	Henerberg et al., 2018
<i>Philophthalmus lucipetus</i>	Philophthalmidae	Adulto	<i>Larus fuscus</i>	Portugal	MG029435	Henerberg et al., 2018
(GE) <i>Metagonimus yokogawai</i>	Heterophyidae	-	-	-	NC023249	Não publicado
(GE) <i>Paragonimus westermani</i>	Troglotrematidae	-	-	Japão	AF286337	Van Herwerden et al., 2000

Quadro 9- Apêndice 1. Identificação de sequências da Superfamília Paramphistomoidea utilizadas para análise molecular no presente estudo

Marcador Ribossomal 28S						
Espécie	Família	Forma	Hospedeiro	Localidade	Nº Acesso GB	Referência
<i>Amurotrema dombrowskajae</i>	Cladorchiidae	Adulto	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Rússia	KT321869	Sokolov et al., 2016
<i>Calicophoron shillongensis</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	Índia	JX678276	Não publicado
<i>Carmyerius spatiosus</i>	Gastrothylacidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	Índia	JX518958	Ghatani et al., 2014
<i>Dadaytrema gracilis</i>	Cladorchiidae	Adulto	<i>Pimelodus blochii</i>	Brasil	MK604827	Pantoja, et al., 2019
<i>Diplodiscus japonicus</i>	Diplodiscidae	Adulto	<i>Rana dybowskii</i>	Rússia	KX506853	Besprozvannykh et al., 2018
<i>Diplodiscus mehrai</i>	Diplodiscidae	Adulto	<i>Rana dybowskii</i>	Rússia	KX506857	Besprozvannykh et al., 2018
<i>Diplodiscus</i> sp.	Diplodiscidae	Adulto	<i>Odorrana grahami</i>	China	MH277508	Não publicado
<i>Doradamphistoma bacuense</i>	Cladorchiidae	Adulto	<i>Platydoras costatus</i>	Peru	MK604806	Pantoja, et al., 2019
<i>Explanatum explanatum</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	Índia	JX678248	Shylla et al., 2013
<i>Fischoederius cobboldi</i>	Gastrothylacidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	Índia	JX518963	Ghatani et al., 2014
<i>Fischoederius elongatus</i>	Gastrothylacidae	Adulto	<i>Bubalus bubalis</i>	Índia	JX518966	Ghatani et al., 2014
<i>Gastrodiscoides hominis</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Sus scrofa domestica</i>	Índia	JX678246	Shylla et al., 2013
<i>Gastrothylax crumenifer</i>	Gastrothylacidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	Índia	JX518969	Ghatani et al., 2014
<i>Gastrothylax crumenifer</i>	Gastrothylacidae	Adulto	<i>Bubalus bubalis</i>	Índia	JX518971	Ghatani et al., 2014
<i>Gastrothylax</i> sp.	Gastrothylacidae	Adulto	<i>Capra hircus</i>	Índia	KY786331	Não publicado
<i>Homalogaster paloniae</i>	Gastrodiscidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	Índia	JX678247	Shylla et al., 2013
<i>Leiperocotyle meghalayensis</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	Índia	JX678280	Não publicado
<i>Olveria bosi</i>	Olveriidae	Adulto	<i>Capra circus</i>	Índia	JX678274	Shylla et al., 2013
<i>Olveria indica</i>	Olveriidae	Adulto	<i>Capra circus</i>	Índia	JX678275	Shylla et al., 2013
<i>Orthocoelium orthocoelium</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	Índia	JX678279	Shylla et al., 2013
<i>Orthocoelium</i> sp.	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos frontalis</i>	Índia	JX678281	Shylla et al., 2013
<i>Orthocoelium streptocoelium</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	Índia	JX678277	Shylla et al., 2013
<i>Paramphistomum cervi</i>	Paramphistomidae	Adulto	Ovino	China	KJ459936	Zheng et al., 2014
<i>Paramphistomum epiclitum</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	Índia	JX628580	Shylla et al., 2013
<i>Pseudocladorchis nephrodorchis</i>	Cladorchiidae	-	<i>Tometes kranponhah</i>	Brasil	MK604805	Pantoja et al., 2019
<i>Solenorchis travassosi</i>	Cladorchiidae	Adulto	<i>Dugong dugon</i>	Austrália	AY222213	Olson et al., 2003
<i>Velasquezotrema tripurensis</i>	Gastrothylacidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	Índia	JX518957	Ghatani et al., 2014
<i>Wardius zibethicus</i>	Zygocotylidae	Adulto	<i>Ondatra zibethicus</i>	EUA	JQ670847	Detwiler et al., 2012
<i>Zygocotyle lunata</i>	Zygocotylidae	Cercária	<i>B. straminea</i>	Brasil	MT514525	Alves et al., 2020

Quadro 10- Apêndice 1. Identificação de sequências da Superfamília Paramphistomoidea utilizadas para análise molecular no presente estudo

Marcador Ribossomal ITS-2						
Espécie	Família	Forma	Hospedeiro	Localidade	N° Acesso GB	Referência
<i>Calicophoron daubneyi</i>	Paramphistomidae	Adulto	Bovino	Islândia	KP201674	Chryssafidis et al., 2015
<i>Calicophoron microbothrium</i>	Paramphistomidae	Adulto	Caprino	Quênia	KX668901	Laidemitt et al., 2016
<i>Calicophoron microbothrium</i>	Paramphistomidae	Adulto	Bovino	Quênia	KX668941	Laidemitt et al., 2016
<i>Calicophoron microbothrioides</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos taurus</i>	Chile	MK683493	Cerda et al., 2019
<i>Calicophoron phillerouxi</i>	Paramphistomidae	Adulto	Bovino	Quênia	KX668911	Laidemitt et al., 2016
<i>Carmyerius exoporus</i>	Gastrothylacidae	Adulto	<i>Bos</i> sp.	Quênia	KX668983	Laidemitt et al., 2016
<i>Carmyerius gregarius</i>	Paramphistomidae	Adulto	Bovino	Quênia	KX668938	Laidemitt et al., 2016
<i>Carmyerius mancupatus</i>	Gastrothylacidae	Adulto	<i>Capra</i> sp.	Quênia	KX668904	Laidemitt et al., 2016
<i>Dadaytrema minimum</i>	Cladorchiidae	Adulto	<i>Pimelodus</i> sp.	Brasil	MK604812	Pantoja et al., 2019
<i>Dadaytrema oxycephalum</i>	Cladorchiidae	Adulto	<i>Pterodoras granulatus</i>	Brasil	MK604811	Pantoja et al., 2019
<i>Diplodiscus japonicus</i>	Diplodiscidae	Adulto	<i>Rana dybowskii</i>	Rússia	KX506854	Besprozvannykh 2017
<i>Diplodiscus mehrai</i>	Diplodiscidae	Adulto	<i>Rana dybowskii</i>	Rússia	KX506856	Besprozvannykh 2017
<i>Doramphistoma bacuense</i>	Cladorchiidae	Adulto	<i>Oxydorcas niger</i>	Brasil	MK604809	Pantoja et al., 2019
<i>Explanatum explanatum</i>	Paramphistomidae	Adulto	Ruminante	Índia	LC101683	Mohanta et al., 2017
<i>Fischoederius elongatus</i>	Gastrothylacidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	Índia	GU133062	Shylla et al., 2011
<i>Gastrothylax crumenifer</i>	Gastrothylacidae	Adulto	Ovino	Índia	MG183681	Satish et al., 2017
<i>Gastrothylax crumenifer</i>	Gastrothylacidae	Adulto	<i>Bubalus bubalis</i>	Índia	JQ688413	Ghatani et al., 2014
<i>Gastrodiscoides hominis</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Sus scrofa domestica</i>	Índia	EF027096	Goswami et al., 2009
<i>Megalodiscus temperatus</i>	Cladorchiidae	Adulto	<i>Lithobates catesbeianus</i>	Japão	AB818374	Hasegawa et al., 2013
<i>Orthocoelium streptocoelium</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	Índia	GU133058	Shylla et al., 2011
<i>Paramphistomum cervi</i>	Paramphistomidae	Adulto	Ovino	China	KJ459937	Zheng, et al., 2014
<i>Paramphistomum leydeni</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Cervus elaphus</i>	Croácia	KX274232	Sindicic et al., 2017
<i>Paramphistomum leydeni</i>	Paramphistomidae	Adulto	Ovino	Argentina	HM209066	Sanabria et al., 2011
<i>Stephanopharynx compactus</i>	Stephanopharyngidae	Adulto	<i>Bos</i> sp.	Zâmbia	KP639630	Dube et al., 2015
<i>Zygocotyle lunata</i>	Zygocotylidae	Cercária	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil	MT514521	Alves et al., 2020
(GE) <i>Ogmocotyle sikae</i>	Notocotylidae	Adulto	-	China	KF008246	Não publicado

Quadro 11- Apêndice 1. Identificação de sequências Superfamília Paramphistomoidea utilizadas para análise molecular no presente estudo

Marcador Mitocondrial COI região barcode						
Espécie	Família	Forma	Hospedeiro	Localidade	Nº Acesso GB	Referência
<i>Calicophoron clavula</i>	Paramphistomidae	Adulto	Bovino	Quênia	KX670151	Laidemitt et al. 2017
<i>Calicophoron microbothrium</i>	Paramphistomidae	Adulto	Bovino	Quênia	KX670115	Laidemitt et al. 2017
<i>Calicophoron microbothrioides</i>	Paramphistomidae	Adulto	Caprino	China	KR337555	Ma et al., 2015
<i>Calicophoron phillerouxi</i>	Paramphistomidae	Adulto	Ovino	Quênia	KX670107	Laidemitt et al., 2017
<i>Calicophoron raja</i>	Paramphistomidae	Adulto	Caprino	Quênia	KX670106	Laidemitt et al. 2017
<i>Calicophoron raja</i>	Paramphistomidae	Adulto	Ovino	Quênia	KX670122	Laidemitt et al. 2017
<i>Calicophoron sukari</i>	Paramphistomidae	Cercária	<i>B. pfeifferi</i>	Quênia	MN603500	Laidemitt et al., 2019
<i>Carmyerius exoporus</i>	Gastrothylacidae	Adulto	Bovino	Quênia	KX670212	Laidemitt et al. 2017
<i>Carmyerius mancupatus</i>	Gastrothylacidae	Cercária	<i>Ceratophallus natalensis</i>	Quênia	KX670146	Laidemitt et al. 2017
<i>Carmyerius mancupatus</i>	Gastrothylacidae	Adulto	Bovino	Quênia	KX670134	Laidemitt et al. 2017
<i>Explanatum explanatum</i>	Paramphistomidae	-	-	China	NC027958	Não publicado
<i>Fischoederius elongatus</i>	Gastrothylacidae	Adulto	Bovino	China	KM397348	Han et al., 2020
<i>Gastrothylax crumenifer</i>	Gastrothylacidae	Adulto	Bovino	China	KM400624	Yang et al., 2016
<i>Gastrothylax crumenifer</i>	Gastrothylacidae	Adulto	Bovino	China	NC027833	Yang et al., 2016
<i>Megalodiscus</i> sp.	Cladorchiidae	-	<i>Rana pipiens</i>	Canadá	KM538103	Van Steenkiste et al., 2015
<i>Paramphistomum cervi</i>	Paramphistomidae	Adulto	Caprino	China	KT198987	Ma et al., 2015
<i>Paramphistomum cervi</i>	Paramphistomidae	Adulto	Yak (inf. exp)	China	KF475773	Yan e tal., 2013
<i>Paramphistomum leydeni</i>	Paramphistomidae	Adulto	Caprino	China	KP341657	Ma et al., 2015
<i>Zygocotyle lunata</i>	Zygocotylidae	Adulto	<i>Branta canadensis</i>	Canadá	KM538121	Van Steenkiste et al., 2015
<i>Zygocotyle lunata</i>	Zygocotylidae	Cercária	<i>B. straminea</i>	Brasil	MT511662	Alves et al., 2020
(GE) <i>Ogmocotyle sikae</i>	Notocotylidae	Adulto	-	China	NC027112	Não publicado

Quadro 12- Apêndice 1. Identificação de sequências da Superfamília Paramphistomoidea utilizadas para análise molecular no presente estudo.

Marcador Mitocondrial COI região pós barcode						
Espécie	Família	Forma	Hospedeiro	Localidade	Nº Acesso GB	Referência
<i>Calicophoron calicophorum</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	India	JX678269	Não publicado
<i>Calicophoron calicophorum</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	India	JX678236	Não publicado
<i>Calicophoron daubneyi</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos taurus</i>	Alemanha	MK052977	Não publicado
<i>Calicophoron</i>	Paramphistomidae	Adulto	Caprino	China	KR337555	Não publicado
<i>Dadaytrema minimum</i>	Cladorchiidae	Adulto	<i>Pimelodus</i> sp.	Brasil	MN037798	Pantoja, et al., 2019
<i>Doradamphistoma bacuense</i>	Cladorchiidae	Adulto	<i>Megalodoras</i>	Peru	MK907334	Pantoja, et al., 2019
<i>Explanatum explanatum</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	India	JX678245	Não publicado
<i>Leiperocotyle meghalayensis</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	India	JX678238	Não publicado
<i>Megalodiscus temperatus</i>	Cladorchiidae	Adulto	<i>Lithobates</i>	Japão	AB818372	Hasegawa et al., 2013
<i>Olveria bosi</i>	Olveriidae	Adulto	<i>Capra hircus</i>	India	JX628581	Não publicado
<i>Olveria indica</i>	Olveriidae	Adulto	<i>Capra hircus</i>	India	JX678237	Não publicado
<i>Orthocoelium orthocoelium</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	India	JX678240	Não publicado
<i>Orthocoelium</i> sp.	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	India	JX678242	Não publicado
<i>Orthocoelium streptocoelium</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	India	JX678235	Não publicado
<i>Paramphistomum cervi</i>	Paramphistomidae	-	-	China	KT198987	Não publicado
<i>Paramphistomum epiclitum</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	India	JX678271	Não publicado
<i>Paramphistomum epiclitum</i>	Paramphistomidae	Adulto	<i>Bos indicus</i>	India	JX678241	Não publicado
<i>Taxorchis</i> sp.	Cladorchiidae	Adulto	<i>H. hydrochaeris</i>	Brasil	-	Presente estudo
<i>Zygocotyle lunata</i>	Zygocotylidae	Cercária	<i>B. straminea</i>	Brasil	MT511662	Alves et al., 2020
(GE) <i>Ogmocotyle sikae</i>	Notocotylidae	Adulto	-	China	NC027112	Não publicado

Quadro 13- Apêndice 1. Identificação de sequências da Superfamília Pronocephaloidea utilizadas para análise molecular no presente estudo.

Marcador Ribossomal 28S						
Espécie	Família	Forma	Hospedeiro	Localidade	Nº Acesso	Referência
<i>Catatropis indicus</i>	Notocotylidae	Adulto	<i>Cairina moschata</i>	Austrália	AY222220	Olson et al., 2003
<i>Catatropis vietnamensis</i>	Notocotylidae	Adulto	<i>Cairina moschata</i> (E)	Vietnã	MH750021	Izrailskaia et al., 2019
<i>Hippocrepis hippocrepis</i>	Notocotylidae	Cercária	<i>B. straminea</i>	Brasil	MN270933	Assis et al., 2019
<i>Hippocrepis hippocrepis</i>	Notocotylidae	Cercária	<i>B. straminea</i>	Brasil	MN270932	Assis et al., 2019
<i>Hippocrepis hippocrepis</i>	Notocotylidae	Adulto	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Brasil	MN270934	Assis et al., 2019
<i>Labicola elongata</i>	Labicolidae	Adulto	<i>Dugong dugon</i>	Austrália	AY222221	Olson et al., 2003
<i>Lankatrema mannarensis</i>	Ophistotrematidae	Adulto	<i>Dugong dugon</i>	Austrália	AY222222	Olson et al., 2003
<i>Macrovestibulum</i> sp.	Pronocephalidae	Adulto	<i>Trachemys scripta</i>	EUA	AY116877	Olson et al., 2003
<i>Notocotylus atlanticus</i>	Notocotylidae	Adulto	<i>Anas platyrhynchos</i>	Rússia	MH818008	Gonchar et al., 2019
<i>Notocotylus attenuatus</i>	Notocotylidae	Adulto	<i>Aythya ferina</i>	Ucrânia	AF184259	Tkach et al., 2001
<i>Notocotylus intestinalis</i>	Notocotylidae	Cercária	<i>Parafossarulus striatulus</i>	Vietnã	JQ890559	Besprozvannykh et al., 2013
<i>Notocotylus</i> sp.	Notocotylidae	Cercária	<i>Physa gyrina</i>	EUA	EU712725	Hanelt, 2009
<i>Notocotylus</i> sp.	Notocotylidae	Cercária	<i>Radix balthica</i>	Noruega	KY513158	Soldanova et al., 2017
<i>Notocotylus</i> sp.	Notocotylidae	Esporocisto	<i>Stagnicola palustris</i>	Reino Unido	AY222219	Olson et al., 2003
<i>Notocotylus magniovatus</i>	Notocotylidae	Adulto	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Rússia	MH750018	Izrailskaia et al., 2019
<i>Notocotylus malhamensis</i>	Notocotylidae	Adulto	<i>Myodes glareolus</i>	Reino Unido	JQ766939	Boyce et al., 2012
<i>Nudacotyle undicola</i>	Nudacotylidae	Ovo	<i>Trichechus manatus manatus</i>	Colômbia	MF538578	Velez et al., 2018
<i>Ogmogaster antarctica</i>	Notocotylidae	Adulto	<i>Balaenoptera borealis</i>	Argentina	KM258675	Frajia-Fernandez et al., 2015
<i>Opisthotrema dujonis</i>	Ophistotrematidae	Adulto	<i>Dugong dugon</i>	Austrália	AY222223	Olson et al., 2003
<i>Paramonostomum anatis</i>	Notocotylidae	Adulto	<i>Tringa erythropus</i>	Ucrânia	AF184258	Tkach et al., 2001
<i>Pseudocatropis dvoryadkini</i>	Notocotylidae	Adulto	<i>Cairina moschata</i> (E)	Rússia	MH750024	Izrailskaia et al., 2019
<i>Quinqueserialis quinqueserialis</i>	Notocotylidae	Adulto	<i>Ondatra zibethicus</i>	EUA	JQ670848	Detwiler et al., 2012
<i>Taprobanella bicaudata</i>	Rhabdiopoeidae	Adulto	<i>Dugong dugon</i>	Austrália	AY222217	Olson et al., 2003
<i>Diplodiscus mehrai</i> (GE)	Diplodiscidae	-	-	Rússia	KX506857	Besprozvannykh et al., 2018

APÊNDICE 2

Informações sobre sequências utilizadas para na comparação pareada.

Tabela 1*- Apêndice 2. Comparação pareada de membros da família Clinostomidae com utilização do marcador ribossomal 28S

Espécie	Nº acesso	Valor de similaridade (%) 28s																		
1 <i>Clinostomum</i> sp.	-																			
2 <i>Clinostomum tataxumui</i>	MF398320	100																		
3 <i>Clinostomum tataxumui</i>	MF398321	100	100																	
4 <i>Clinostomum</i> sp.	MH159727	100	100	100																
5 <i>Clinostomum poteae</i>	MH282569	98,1	98,1	98,1	98,1															
6 <i>Clinostomum poteae</i>	MH282568	98,1	98,1	98,1	98,1	100														
7 <i>Clinostomum marginatum</i>	MF398323	97,7	97,7	97,7	97,7	99,5	99,5													
8 <i>Clinostomum marginatum</i>	KU708007	97,7	97,7	97,7	97,7	99,5	99,5	100												
9 <i>Clinostomum</i> sp.	MH159735	97,5	97,5	97,5	97,5	98,2	98,2	98,5	98,5											
10 <i>Clinostomum album</i>	KU708008	97,3	97,3	97,3	97,3	98,8	98,8	98,9	98,9	97,6										
11 <i>Clinostomum cutaneum</i>	GQ339114	97,2	97,2	97,2	97,2	98,5	98,5	98,4	98,4	98	97,7									
12 <i>Clinostomum complanatum</i>	MK811210	97,1	97,1	97,1	97,1	98,4	98,4	98,5	98,5	97,9	97,6	99,5								
13 <i>Clinostomum phalacrocoracis</i>	FJ609423	97,1	97,1	97,1	97,1	98,4	98,4	98,3	98,3	97,9	97,6	99,9	99,6							
14 <i>Clinostomum complanatum</i>	FJ609420	97,1	97,1	97,1	97,1	98,4	98,4	98,5	98,5	97,9	97,6	99,5	100	99,6						
15 <i>Clinostomoides brienii</i>	KF781299	96,2	96,2	96,2	96,2	97,3	97,3	97,5	97,5	96,6	96,9	98	98,3	98,1	98,3					
16 <i>Odhneriotrema incommodum</i>	MF765998	93,9	93,9	93,9	93,9	94,3	94,3	94,6	94,6	94,2	94,3	94,5	94,4	94,4	94,4	94,2				
17 <i>Odhneriotrema incommodum</i>	MN696161	93,9	93,9	93,9	93,9	94,3	94,3	94,6	94,6	94,2	94,3	94,5	94,4	94,4	94,4	94,2				
18 <i>Ithyoclinostomum yamagutii</i>	MN696162	91,6	91,6	91,6	91,6	92,6	92,6	92,7	92,7	93	92,6	93,1	93	93	93	92,3	91,9	91,9		
19 <i>Ithyoclinostomum yamagutii</i>	MN696160	91,6	91,6	91,6	91,6	92,6	92,6	92,7	92,7	93	92,6	93,1	93	93	93	92,3	91,9	91,9	100	
20 <i>A. compactum</i> (GE)	MH373586	80,8	80,8	80,8	80,8	80,4	80,4	80,5	80,5	80,9	80,5	81,1	81	81	81	80,4	81,7	81,7	80,7	80,7

*Algumas sequências que representam parasitos da mesma espécie e com o mesmo valor de similaridade não foram apresentadas.

Tabela 2*- Apêndice 2. Comparação pareada de membros da família Clinostomidae com utilização do marcador ribossomal ITS

Espécie	Nº acesso	Valor de similaridade (%) ITS																												
1 <i>Clinostomum</i> sp.	-																													
2 <i>Clinostomum cichlidorum</i>	KU156773	100																												
3 <i>Clinostomum cichlidorum</i>	KJ477670	100	100																											
4 <i>Clinostomum tataxumui</i>	KJ477673	100	100	100																										
5 <i>Clinostomum tataxumui</i>	KJ477675	100	100	100	100																									
6 <i>Clinostomum tataxumui</i>	KU156742	100	100	100	100	100																								
7 <i>Clinostomum</i> sp.	KP110574	98,7	98,7	98,7	98,7	98,7	98,7																							
8 <i>Clinostomum caffarae</i>	KU156758	98,7	98,7	98,7	98,7	98,7	98,7	100																						
9 <i>Clinostomum arqquus</i>	KJ477587	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2	99,5	99,5																					
10 <i>Clinostomum</i> sp. 3	KU156767	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2	99,5	99,5	99																				
11 <i>Clinostomum</i> sp. 3	KJ477597	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2	99,5	99,5	99	99,7																			
12 <i>Clinostomum arqquus</i>	KJ477664	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2	98,2	99,5	99,5	100	99	99																		
13 <i>Clinostomum attenuatum</i>	KP150307	97	97	97	97	97	97	98	98	97,8	97,7	97,7	97,8																	
14 <i>Clinostomum marginatum</i>	MH042927	97	97	97	97	97	97	98	98	97,8	97,7	97,7	97,8	100																
15 <i>Clinostomum marginatum</i>	MH282555	97	97	97	97	97	97	98	98	97,8	97,7	97,7	97,8	100	100															
16 <i>Clinostomum album</i>	MH282566	96,6	96,6	96,6	96,6	96,6	96,6	97,7	97,7	97,4	97,1	97,1	97,4	99,2	99,2	99,2														
17 <i>Clinostomum detruncatum</i>	KP110566	95,6	95,6	95,6	95,6	95,6	95,6	96,5	96,5	96,2	96	96,1	96,2	96,7	96,7	96,7	96,7													
18 <i>Clinostomum heluans</i>	MH159770	95,4	95,4	95,4	95,4	95,4	95,4	96	96	95,7	95,4	95,4	95,7	96,3	96,3	96,3	96,5	94,8												
19 <i>Clinostomum heluans</i>	KPP110577	95,4	95,4	95,4	95,4	95,4	95,4	96	96	95,7	95,4	95,4	95,7	96,3	96,3	96,3	96,5	94,8	100											
20 <i>Clinostomum caffarae</i>	KU156761	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	96,1	96,1	95,8	95,6	95,6	95,8	96,3	96,3	96,3	96,1	96,9	94,3	94,3										
21 <i>Clinostomum</i> sp. 1	KU156763	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	96,1	96,1	95,8	95,6	95,6	95,8	96,3	96,3	96,3	96,1	96,9	94,3	94,3	100									
22 <i>Clinostomum</i> sp.1	KU156766	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	96,1	96,1	95,8	95,6	95,6	95,8	96,3	96,3	96,3	96,1	96,9	94,3	94,3	100	100								
23 <i>Clinostomum</i> sp.	KJ789387	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	96,1	96,1	95,8	95,6	95,6	95,8	96,3	96,3	96,3	96,1	96,9	94,3	94,3	100	100	100							
24 <i>Clinostomum</i> sp.	KJ789384	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	95,3	96,1	96,1	95,8	95,6	95,6	95,8	96,3	96,3	96,3	96,1	96,9	94,3	94,3	100	100	100	100						
25 <i>Odhneriotrema incommodum</i>	MF765998	87,2	87,2	87,2	87,2	87,2	87,2	87,9	87,9	87,5	87,9	87,7	87,5	88,1	88,1	88,1	87,6	86,4	86,7	86,7	86	86	86	86						
26 <i>Euclinostomum heterostomum</i>	KP721439	85,2	85,2	85,2	85,2	85,2	85,2	86	86	85,8	85,9	85,8	85,8	86,4	86,4	86,4	86,9	85,2	85,9	85,9	84,5	84,5	84,5	84,5	87,3					
27 <i>Ithyoclinostomum</i> sp.	MH159769	84,6	84,6	84,6	84,6	84,6	84,6	84,9	84,9	84,5	84,7	84,7	84,5	85,5	85,5	85,5	85,4	84,1	84,2	84,2	84,3	84,3	84,3	84,3	85,1	82,1				
28 <i>Ithyoclinostomum yamagutii</i>	MN696162	84,6	84,6	84,6	84,6	84,6	84,6	84,9	84,9	84,5	84,7	84,7	84,5	85,5	85,5	85,5	85,4	84,1	84,2	84,2	84,3	84,3	84,3	84,3	84,3	85,1	82,1	100		
29 <i>A. compactum</i> (GE)	MN179270	67,2	67,2	67,2	67,2	67,2	67,2	67,5	67,5	67,5	67,5	67,5	67,5	67,8	67,5	67,6	67,6	67,6	67,5	67	67	67	67,5	67,5	67,5	67,5	68,7	67,4	66,1	66,1

*Algumas sequências que representam parasitos da mesma espécie e com o mesmo valor de similaridade não foram apresentadas.

Tabela 4- Apêndice 2. Comparação pareada de membros da superfamília Diplostomoidea com utilização do marcador ribossomal 28S

Espécie	N° acesso	Valor de similaridade (%) 28S																			
1 <i>Tylodelphys</i> sp.	-																				
2 Diplostomidae gen. sp. 1	KT728779	99,5																			
3 Diplostomidae gen. sp. 1	KT728774	99,5	100																		
4 <i>Tylodelphys</i> sp.	KU588150	98,4	98	98																	
5 <i>Austrodiplostomum compactum</i>	MF624789	98,4	98	98	97,2																
6 <i>Austrodiplostomum compactum</i>	MH373586	98,4	98	98	97,2	100															
7 <i>Tylodelphys azteca</i>	MF624787	98,3	97,8	97,8	98	97,3	97,3														
8 <i>Tylodelphys azteca</i>	MF398337	98,3	97,8	97,8	98	97,3	97,3	100													
9 Diplostomidae gen. sp. 1	KT728773	98,3	97,8	97,8	97	99,5	99,5	97,2	97,2												
10 <i>Austrodiplostomum</i> sp. 2	MH373592	98,3	97,8	97,8	97	99,5	99,5	97,2	97,2	100											
11 <i>Austrodiplostomum mordax</i>	MH373583	97,6	97,5	97,5	97	98	98	96,2	96,2	97,8	97,8										
12 <i>Tylodelphys mashonensis</i>	KF189071	97,3	97,2	97,2	97	96,4	96,4	97,5	97,5	96,5	96,5	95,9									
13 <i>Alaria mustelae</i>	JF820605	95	95,1	95,1	94,2	94	94	94,2	94,2	93,9	93,9	93,9	95								
14 <i>Apharyngostrigea pipientis</i>	JF820597	94,8	94,3	94,3	93,7	93,9	93,9	94,5	94,5	94	94	93,4	94,3	95,3							
15 <i>Uvulifer weberi</i>	MK874326	93,9	93,4	93,4	94	93,6	93,6	93,1	93,1	93,7	93,7	93,7	93,6	94,3	94						
16 <i>Hysteromorpha triloba</i>	MH521250	93,9	93,7	93,7	92,8	93,6	93,6	93,4	93,4	93,7	93,7	93,2	93,9	95,6	94,8	94,5					
17 Crassiphialinae gen. sp.	MT394053	93,6	93,4	93,4	93,4	93,6	93,6	92,8	92,8	93,7	93,7	93,4	93,2	94,7	93,9	96,9	95,8				
18 <i>Apatemon gracilis</i>	KY513177	93,4	92,9	92,9	92,5	92,8	92,8	92,8	92,8	92,9	92,9	92	93,2	93,7	97,6	92,6	93,4	92,5			
19 <i>Neodiplostomum americanum</i>	MK112278	93,1	92,9	92,9	91,8	92	92	92,2	92,2	92,2	92,2	91,7	92,2	93,2	93,4	91,8	93,7	92,6	92,3		
20 <i>Australapatemon niewiadomski</i>	KT334165	91,2	91,4	91,4	90,7	90,9	90,9	90,6	90,6	91,1	91,1	91,4	91,4	92,5	95,1	91,4	91,4	91,2	95,3	91,2	
21 <i>Posthodiplostomum</i> sp.	MT394051	90,9	90,7	90,7	90,6	90,3	90,3	89,6	89,6	90,1	90,1	90,7	90	91,7	90,7	91,5	91,2	91,7	89,5	90,4	89,5

Tabela 6- Apêndice 2. Comparação pareada de membros da superfamília Echinostomatoidea com utilização do marcador ribossomal 28S

Espécie	Nº acesso	Valor de similaridade (%)																				
1 <i>Cyclocoelum mutabile</i>	-																					
2 <i>Cyclocoelum mutabile</i>	AY222249	92,4																				
3 <i>Typhlocoelum cucumerinum</i>	-	95,3	91,9																			
4 <i>Typhlocoelum</i> sp.	KT956960	95,6	92,3	99,3																		
5 <i>Tracheophilus cymbius</i>	MK327367	95,4	92,3	99,1	99,8																	
6 <i>Neohaematotrephus arayae</i>	MH725787	92,2	90,9	92,1	92,3	92,3																
7 <i>Echinostoma</i> sp.	-	90,9	87,2	89,6	89,9	89,7	86,7															
8 <i>Echinostoma caproni</i>	MK482501	91	87,2	89,6	89,9	89,7	86,8	99,7														
9 <i>Echinostoma paraensei</i>	EU025867	90,7	87,1	89,7	89,9	89,8	86,6	99,4	99,3													
10 <i>Echinostoma revolutum</i>	AY222246	90,5	86,6	89,3	89,6	89,4	86,3	99,3	99,2	99,5												
11 <i>Echinoparyphium ellisi</i>	KY436410	91,3	87,4	90	90,3	90,3	86,8	97,1	97	96,8	96,7											
12 <i>Fasciola hepatica</i>	-	90,7	87,4	90	90,3	90,1	87	92,9	93	92,6	92,6	93,7										
13 <i>Fasciola hepatica</i>	MF099788	90,7	87,4	90	90,3	90,1	87	92,9	93	92,6	92,6	93,7	100									
14 <i>Fasciola gigantica</i>	MF099787	90,5	87,2	89,9	90,1	89,9	86,8	92,7	92,8	92,4	92,4	93,5	99,8	99,8								
15 <i>Fasciola jacksoni</i>	MF099789	91,2	87,8	90,6	90,9	90,7	87,2	93	93,1	92,6	92,6	93,9	98	98	97,8							
16 <i>Parafasciolopsis fasciolaemorpha</i>	EU025869	90,9	87	90,2	90,4	90,4	86,8	93	93,1	92,6	92,6	93,9	96,4	96,4	96,2	96,6						
17 <i>Philophthalmus gralli</i>	JQ246434	89,8	86,8	89,2	89,5	89,4	86,7	91,7	91,6	91,2	91,2	91,4	91,2	91,2	91,1	90,6	90,7					
18 <i>Philophthalmus gralli</i>	JQ627832	89,8	86,8	89,2	89,5	89,4	86,7	91,7	91,6	91,2	91,2	91,4	91,2	91,2	91,1	90,6	90,7	100				
19 <i>Sphaeridiotrema monorchis</i>	JQ890544	90,4	86,8	89,5	89,5	89,3	87,3	93,1	93,1	92,8	92,8	93,4	91,6	91,6	91,4	91,2	91,8	91,3	91,3			
20 <i>Centrocestus formosanus</i> (GE)	KY075665	83,1	80,8	82,1	82,4	82,3	80,9	83,7	83,9	83,7	83,6	83,8	84,5	84,5	84,4	84,1	84	82,8	82,8	85,1		

Tabela 7- Apêndice 2. Comparação pareada de membros da superfamília Echinostomatoidea com utilização do marcador mitocondrial Nad-1

Espécie	Nº acesso	Valor de similaridade (%)																			
1 <i>Cyclocoelum mutabile</i>	-																				
2 <i>Cyclocoelum mutabile</i>	MH091808	99,7																			
3 <i>Cyclocoelum mutabile</i>	MH091809	99,7	100																		
4 <i>Cyclocoelum mutabile</i>	KU877891	97,1	96,8	96,8																	
5 <i>Cyclocoelum mutabile</i>	KX097823	96,8	96,5	96,5	99,7																
6 <i>Typhlocoelum cucumerinum</i>	-	81,6	81,9	81,9	82,6	82,6															
7 <i>Tracheophilus cymbius</i>	MK355447	83,5	83,9	83,9	83,2	83,2	93,5														
8 <i>Tracheophilus cymbius</i>	NC044135	83,5	83,9	83,9	83,2	83,2	93,5	100													
9 <i>Harrahium tringae</i>	KU877898	83,5	83,2	83,2	82,9	82,9	84,8	85,8	85,8												
10 <i>Harrahium obscurum</i>	KU877897	83,2	82,9	82,9	82,3	82,3	81,3	83,5	83,5	90,6											
11 <i>Hyptiasmus oculus</i>	KU877896	83,9	84,2	84,2	83,2	83,2	81,3	82,9	82,9	79	79										
12 <i>Morishitium polonicum</i>	KU877893	76,8	77,1	77,1	77,7	78,1	77,4	80	80	74,8	73,5	76,8									
13 <i>Echinostoma sp.</i>	-	80,3	80,6	80,6	79,4	79	77,7	79,7	79,7	78,7	77,7	78,1	71,9								
14 <i>Echinostoma_revolutum</i>	KC618454	79,7	80	80	78,7	78,4	76,8	77,7	77,7	78,4	73,9	78,4	71,6	90,6							
15 <i>Fasciola_gigantica</i>	MG972404	78,4	78,7	78,7	78,7	78,4	78,1	78,7	78,7	78,4	78,1	77,4	73,2	85,2	83,9						
16 <i>Fasciola hepatica</i>	-	77,7	78,1	78,1	78,1	77,7	76,8	78,1	78,1	78,1	74,5	76,5	72,9	83,5	82,9	93,5					
17 <i>Philophthalmus lacrymosus</i>	MG029437	76,1	75,8	75,8	76,8	76,5	75,8	74,5	74,5	75,5	73,2	78,4	71,9	76,5	76,5	79	80				
18 <i>Philophthalmus gralli</i>	-	73,9	73,5	73,5	73,9	73,9	73,9	73,5	73,5	74,8	72,3	76,8	71	73,9	75,8	77,1	78,1	85,8			
19 <i>Metagonimus yokogawai</i> (GE)	NC023249	67,1	67,4	67,4	68,7	68,7	69,4	68,7	68,7	66,1	64,2	66,5	65,2	68,4	70	69,4	69,4	66,5	64,8		
20 <i>Paragonimus westermani</i> (GE)	AF286337	61,9	62,3	62,3	62,6	62,3	63,2	63,5	63,5	63,5	64,5	63,5	61,9	65,5	66,1	69	66,5	64,2	63,5	62,9	

Tabela 8- Apêndice 2. Comparação pareada de membros da superfamília Echinostomatoidea com utilização do marcador mitocondrial Nad-1

	Espécie	Nº acesso	Valor de similaridade (%)													
1	<i>Echinostoma sp.</i>	-														
2	<i>Echinostoma revolutum</i>	AY168933	91													
3	<i>Echinostoma revolutum</i>	KC618454	90,6	98,4												
4	<i>Echinostoma robustum</i>	GQ463055	88,4	88,7	88,7											
5	<i>Echinostoma trivolvis</i>	MH369218	87,4	88,4	88,1	86,5										
6	<i>Echinostoma trivolvis</i>	JQ670850	87,7	88,1	87,7	86,8	99									
7	<i>Echinostoma paraensei</i>	AF025834	86,5	85,5	84,8	85,8	87,4	87,4								
8	<i>Fasciola hepatica</i>	-	83,5	82,6	82,9	81,3	80	80	79,4							
9	<i>Fasciola gigantica</i>	MG972405	83,2	81	81,6	79,7	79	79	77,7	93,9						
10	<i>Tracheophilus cymbius</i>	MK355447	79,7	77,1	77,7	75,5	77,7	76,8	75,5	78,1	79					
11	<i>Cyclocoelum mutabile</i>	-	80,3	79,7	79,7	77,7	77,1	76,1	76,5	77,7	77,1	83,5				
12	<i>Typhlocoelum cucumerinum</i>	-	77,7	76,5	76,8	76,1	77,7	77,4	74,2	76,8	77,7	93,5	81,6			
13	<i>Philophthalmus gralli</i>	-	73,9	74,5	75,8	73,9	71,6	71,9	73,2	78,1	76,8	73,5	73,9	73,9		
14	<i>Paragonimus westermani</i> (GE)	AF286337	65,5	66,8	66,1	65,2	62,6	62,6	63,9	66,5	68,7	63,5	61,9	63,2	63,5	
15	<i>Metagonimus yokogawai</i> (GE)	NC023249	68,4	69,4	70	69	67,1	67,4	69,7	69,4	70,3	68,7	67,1	69,4	64,8	62,9

Tabela 10- Apêndice 2. Comparação pareada de membros da superfamília Echinostomatoidea com utilização do marcador mitocondrial Nad-1

Espécie	Nº acesso	Valor de similaridade (%)																								
1 <i>Fasciola hepatica</i>	-																									
2 <i>Fasciola hepatica</i>	-	100																								
3 <i>Fasciola hepatica</i>	KR422394	100	100																							
4 <i>Fasciola hepatica</i>	MK468848	100	100	100																						
5 <i>Fasciola hepatica</i>	MG972400	100	100	100	100																					
6 <i>Fasciola hepatica</i>	MK838742	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7																				
7 <i>Fasciola hepatica</i>	MK838706	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	100																			
8 <i>Fasciola hepatica</i>	MH681801	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	100	100																		
9 <i>Fasciola hepatica</i>	AB207154	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	100	100	100																	
10 <i>Fasciola hepatica</i>	MK838702	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	100	100	100	100																
11 <i>Fasciola hepatica</i>	MF959490	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	100	100	100	100	100															
12 <i>Fasciola hepatica</i>	MF287675	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7														
13 <i>Fasciola hepatica</i>	LC273114	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	100													
14 <i>Fasciola gigantica</i>	MG972405	93,9	93,9	93,9	93,9	93,9	94,2	94,2	94,2	94,2	94,2	94,2	93,9	93,9												
15 <i>Fasciola gigantica</i>	MG972404	93,5	93,5	93,5	93,5	93,5	93,9	93,9	93,9	93,9	93,9	93,9	93,5	93,5	97,1											
16 <i>Fasciola jacksoni</i>	KX787886	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,7	89,4	89,4	89	90,3										
17 <i>Fascioloides magna</i>	KU060148	87,7	87,7	87,7	87,7	87,7	87,7	87,7	87,7	87,7	87,7	87,7	87,4	87,4	85,5	85,8	88,7									
18 <i>Fascioloides magna</i>	NC029481	87,7	87,7	87,7	87,7	87,7	87,7	87,7	87,7	87,7	87,7	87,7	87,4	87,4	85,5	85,8	88,7	100								
19 <i>Echinostoma</i> sp.	-	83,5	83,5	83,5	83,5	83,5	83,9	83,9	83,9	83,9	83,9	83,9	83,5	83,5	83,2	85,2	82,9	80,6	80,6							
20 <i>Fasciolopsis buski</i>	NC030528	81,9	81,9	81,9	81,9	81,9	81,9	81,9	81,9	81,9	81,9	81,9	81,6	81,6	81,6	82,3	81,3	80,3	80,3	78,1						
21 <i>Philophthalmus lacrymosus</i>	MG029437	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80,3	80,3	78,7	79	80,3	77,4	77,4	76,5	78,4					
22 <i>Philophthalmus gralli</i>	-	78,1	78,1	78,1	78,1	78,1	78,1	78,1	78,1	78,1	78,1	78,1	77,7	77,7	76,8	77,1	78,7	76,1	76,1	73,9	74,5	85,8				
23 <i>Typhlocoelum cucumerinum</i>	-	76,8	76,8	76,8	76,8	76,8	77,1	77,1	77,1	77,1	77,1	77,1	76,8	76,8	77,7	78,1	77,7	73,9	73,9	77,7	74,5	75,8	73,9			
24 <i>Cyclocoelum mutabile</i>	-	77,7	77,7	77,7	77,7	77,7	78,1	78,1	78,1	78,1	78,1	78,1	78,4	78,4	77,1	78,4	78,4	75,8	75,8	80,3	72,9	76,1	73,9	81,6		
25 <i>Metagonimus yokogawai</i> (GE)	NC023249	69,4	69,4	69,4	69,4	69,4	69,7	69,7	69,7	69,7	69,7	69,7	69,4	69,4	70,3	69,4	69,7	68,4	68,4	68,4	70	66,5	64,8	69,4	67,1	
26 <i>Paragonimus westermani</i> GE	AF286337	66,5	66,5	66,5	66,5	66,5	66,8	66,8	66,8	66,8	66,8	66,8	66,8	66,8	68,7	69	66,5	65,5	65,5	65,5	63,2	64,2	63,5	63,2	61,9	62,9

Tabela 11- Apêndice 2. Comparação pareada de membros da superfamília Paramphistomatoidea com utilização do marcador ribossomal 28S

Espécie	N° acesso	Valor de similaridade (%) 28S
1 <i>Zygocotyle lunata</i>	MT514525	
2 <i>Wardius zibethicus</i>	JQ670847	97,7
3 <i>Paramphistomum epiclitum</i>	JX628580	96,5 98,4
4 <i>Calicophoron shillongensis</i>	JX678276	96,5 98,6 99,4
5 <i>Gastrothylax crumenifer</i>	JX518971	96,3 98,4 99,4 99,6
6 <i>Paramphistomum cervi</i>	KJ459936	96,2 98,3 98,8 99,1 99,1
7 <i>Fischoederius elongatus</i>	JX518966	96,2 98,3 99,3 99,5 99,9 98,9
8 <i>Gastrothylax crumenifer</i>	JX518969	96,1 98,2 99,2 99,4 99,8 98,8 99,7
9 <i>Velasquezotrema tripurensis</i>	JX518957	96,1 98,4 99,2 99,4 99,8 98,8 99,7 99,8
10 <i>Carmyerius spatiosus</i>	JX518958	96,1 98,2 99,2 99,4 99,8 98,8 99,7 99,6 99,6
11 <i>Olveria indica</i>	JX678275	96 98,3 98,8 99,1 99,3 98,7 99,2 99,3 99,3 99,1
12 <i>Fischoederius cobboldi</i>	JX518963	96 98,1 98,8 99,1 99,5 98,5 99,4 99,3 99,3 98,7
13 <i>Orthocoelium</i> sp.	JX678281	96 98,1 98,8 99,1 99,3 98,5 99,4 99,3 99,1 99,1 99,2 98,7
14 <i>Olveria bosi</i>	JX678274	95,9 98 98,9 99,2 99,4 98,6 99,3 99,4 99,2 99,2 99,3 98,8 99,3
15 <i>Orthocoelium orthocoelium</i>	JX678279	95,9 98 98,9 99,2 99,4 98,6 99,5 99,4 99,2 99,2 99,3 98,8 99,5 99,4
16 <i>Explanatum explanatum</i>	JX678248	95,9 98 98,7 98,9 98,9 99,1 98,8 98,7 98,7 98,7 98,4 98,6 98,4 98,5 98,5
17 <i>Gastrothylax</i> sp.	KY786331	95,9 98 98,9 99,2 99,6 98,6 99,5 99,6 99,4 99,4 99,1 99,1 99,1 99,2 99,2 98,5
18 <i>Gastrodiscoides hominis</i>	JX678246	95,6 97,7 97,6 97,6 97,8 98,1 97,7 97,6 97,6 97,6 97,3 97,3 97,2 97,2 97,2 97,6 97,6
19 <i>Homalogaster paloniae</i>	JX678247	95,6 97,7 97,6 97,6 97,6 98,1 97,5 97,4 97,4 97,4 97,3 97,1 97,2 97,4 97,2 97,4 97,4 99,2
20 <i>Orthocoelium streptocoelium</i>	JX678277	95,2 97,3 98,2 98,4 98,6 97,9 98,5 98,6 98,4 98,4 98,5 98,1 98,5 98,6 98,6 98 98,4 96,4 96,6
21 <i>Leiperocotyle meghalayensis</i>	JX678280	94,3 96,6 97,4 97,6 97,6 97,3 97,5 97,6 97,6 97,4 97,9 97,3 97,5 97,6 97,8 97,1 97,4 95,6 95,6 97,2
22 <i>Pseudocladorchis</i>	MK604805	91,4 93,4 92,6 92,7 92,7 92,8 92,8 92,5 92,7 92,6 92,6 92,6 92,4 92,7 92,6 92,9 92,5 92,9 93,1 91,9 91,5
23 <i>Dadaytrema gracilis</i>	MK604827	90,9 92,8 92,1 92,2 92,2 92,5 92,3 92 92,2 92,1 92,1 92,1 92 92,2 92,1 92,2 92,1 92,2 92,1 92,6 92,9 91,4 90,9 98,5
24 <i>Doradamphistoma bacuense</i>	MK604806	90,4 92,4 91,9 92 92 92,1 92,1 91,8 92 91,9 91,9 92,1 91,8 92 91,9 92,4 91,6 92 92,3 91,4 90,8 96,5 96,4
25 <i>Diplodiscus japonicus</i>	KX506853	90,1 92,2 91,9 91,9 92,1 92,1 92,2 91,9 92,1 92,2 91,7 92,1 91,6 91,7 91,7 92 91,7 91,6 91,6 91,1 90,1 91,8 91,7 91,8
26 <i>Diplodiscus</i> sp.	MH277508	90 92,1 91,9 91,7 92,1 92,1 92,2 91,9 92,1 92,2 91,8 92,1 91,6 91,7 91,7 92 91,7 91,7 91,5 91,1 90,1 91,8 91,7 91,8 98,5
27 <i>Indosolenorchis hirudinaceus</i>	AY222213	90 91,8 91,8 91,5 91,7 91,8 91,8 91,5 91,5 91,6 91,2 91,5 91,2 91,3 91,4 91,7 91,4 92 91,6 90,5 89,9 91,8 91,2 90,7 90,3 90,5
28 <i>Diplodiscus mehrai</i>	KX506857	90 92,1 91,8 91,8 92 92 92,1 91,8 92 92,1 91,6 92 91,5 91,6 91,6 91,9 91,6 91,7 91,5 90,9 90 91,8 91,7 91,8 99,2 99,2 90,3
29 <i>Amurotrema dombrowskajae</i>	KT321869	89,9 91,8 91,8 91,5 91,7 91,8 91,8 91,5 91,7 91,6 91,6 91,7 91,6 91,5 91,6 91,4 91,6 91,8 91,8 90,6 90,3 91,2 91,1 90,9 89,9 90,1 91,7 89,9
30 <i>Notocotylus magniovatus</i> (GE)	KT321869	83,6 85,2 84,9 84,8 84,8 85,1 84,9 84,7 84,8 84,9 84,8 84,5 84,6 84,8 84,8 85,2 84,7 85,6 85,8 84,5 83,9 86,9 87,1 86,2 85,3 85,5 84,6 85,5 84,5

Tabela 14- Apêndice 2. Comparação pareada de membros da superfamília Paramphistomatoidea com utilização do marcador mitocondrial COI (barcode)

Espécie	Nº acesso	Valor de similaridade (%) barcode																			
1	<i>Zygotocyle lunata</i>	MT511662																			
2	<i>Zygotocyle lunata</i>	KM538121	99,5																		
3	<i>Fischoederius elongatus</i>	KM397348	85,6	85,1																	
4	<i>Paramphistomum leydeni</i>	KP341657	85,1	84,6	83,1																
5	<i>Paramphistomum cervi</i>	KF475773	84,8	84,8	85,1	87,1															
6	<i>Paramphistomum cervi</i>	KT198987	84,8	84,8	85,1	87,1	100														
7	<i>Explanatum explanatum</i>	NC027958	84,6	84,6	84,3	87,6	87,3	87,3													
8	<i>Carmyerius mancupatus</i>	KX670134	84,6	84,1	86,3	82,3	85,6	85,6	84,6												
9	<i>Carmyerius mancupatus</i>	KX670146	84,6	84,1	86,3	82,3	85,6	85,6	84,6	99,8											
10	<i>Calicophoron microbothrioides</i>	KR337555	84,3	84,3	84,8	84,1	86,8	86,8	86,6	84,1	84,1										
11	<i>Calicophoron sukari</i>	MN603500	84,6	84,6	84,3	83,8	88,6	88,6	86,1	84,8	84,8	86,3									
12	<i>Calicophoron raja</i>	KX670106	83,6	83,6	84,1	84,3	87,3	87,3	87,8	84,8	84,8	86,1	87,3								
13	<i>Calicophoron raja</i>	KX670122	83,3	83,3	83,8	84,6	87,6	87,6	87,6	85,1	85,1	85,8	87,3	99,5							
14	<i>Calicophoron phillerouxi</i>	KX670107	83,3	82,8	83,8	84,8	87,8	87,8	85,6	84,8	84,8	85,6	86,1	88,1	88,1						
15	<i>Gastrothylax crumenifer</i>	KM400624	83,1	83,1	84,8	82,1	84,3	84,3	84,6	87,6	87,6	85,1	84,3	84,3	84,6	81,8					
16	<i>Gastrothylax crumenifer</i>	NC027833	83,1	83,1	84,8	82,1	84,3	84,3	84,6	87,6	87,6	85,1	84,3	84,3	84,6	81,8	100				
17	<i>Calicophoron microbothrium</i>	KX670115	82,8	82,3	84,3	84,8	87,8	87,8	85,1	85,1	85,1	85,6	86,1	88,6	88,6	99,5	81,3	81,3			
18	<i>Calicophoron clavula</i>	KX670151	82,3	82,3	84,8	86,6	88,8	88,8	86,8	85,6	85,6	85,1	86,6	90,5	91	87,3	82,3	82,3	87,3		
19	<i>Carmyerius exoporus</i>	KX670212	82,3	82,3	86,1	80,3	83,3	83,3	82,3	87,8	87,6	82,3	83,6	82,6	82,3	82,6	85,3	85,3	82,8	82,6	
20	<i>Ogmocotyle sikae</i> (GE)	NC027112	74,9	74,4	74,9	74,9	72,4	72,4	72,1	74,4	74,6	72,9	73,6	73,1	72,9	74,1	74,4	74,4	73,9	72,4	72,9

Tabela 15- Apêndice 2. Comparação pareada de membros da superfamília Paramphistomatoidea com utilização do marcador mitocondrial COI (pós-barcode)

Espécie	Nº acesso	Valor de similaridade (%)																			
1 <i>Zygocotyle lunata</i>	MT514525																				
2 <i>Calicophoron daubneyi</i>	MK052977	89,5																			
3 <i>Orthocoelium</i> sp.	JX678242	88	89,1																		
4 <i>Explanatum explanatum</i>	JX678245	88	89,1	89,1																	
5 <i>Paramphistomum cervi</i>	KT198987	87,6	89,8	88	90,2																
6 <i>Orthocoelium orthocoelium</i>	JX678240	87,6	88,7	99,3	88,4	87,6															
7 <i>Paramphistomum epiclitum</i>	JX678271	87,6	88,4	85,8	87,3	86,5	85,5														
8 <i>Orthocoelium streptocoelium</i>	JX678235	87,3	89,5	91,3	89,5	88,7	90,9	88													
9 <i>Calicophoron calicophorum</i>	JX678236	87,3	88	88	88,4	87,3	87,6	87,3	89,8												
10 <i>Leiperocotyle meghalayensis</i>	JX678238	87,3	89,1	88,7	89,8	89,1	88,4	86,2	88,4	87,6											
11 <i>Paramphistomum epiclitum</i>	JX678241	86,9	87,6	85,1	87,3	85,8	84,7	98,9	87,3	87,3	86,2										
12 <i>Calicophoron calicophorum</i>	JX678269	86,9	87,6	87,3	87,6	86,9	86,9	86,5	89,1	99,3	87,6	86,5									
13 <i>Calicophoron microbothrioides</i>	KR337555	86,5	89,1	88	88,4	88	87,3	88	88	88,4	87,6	88	87,6								
14 <i>Olveria bosi</i>	JX628581	85,8	88	89,5	85,8	86,9	89,1	85,5	89,1	89,1	87,3	84,7	88,4	86,9							
15 <i>Olveria indica</i>	JX678237	85,5	88	86,5	86,9	86,9	85,8	88	86,5	87,6	86,5	87,3	87,6	86,9	88,4						
16 <i>Taxorchis</i> sp.	-	85,1	86,5	84,7	84	84,7	84,4	85,1	84,4	85,8	85,8	84,4	85,5	82,9	85,5	84,4					
17 <i>Megalodiscus temperatus</i>	AB818372	84,4	82,9	82,5	82,5	81,5	81,8	81,8	80	80	80,4	81,1	79,6	80,7	81,1	80,4	83,6				
18 <i>Doradamphistoma bacuense</i>	MK907334	84	83,6	84,4	82,5	83,3	84,4	81,5	82,5	82,5	81,8	80,7	81,8	83,3	83,6	83,3	83,6	82,5			
19 <i>Dadaytrema minimum</i>	MN037798	81,8	82,9	84	81,8	82,2	83,3	81,5	82,5	82,5	81,5	80,7	81,8	81,1	82,2	81,5	84,4	81,5	88,4		
20 <i>Ogmocotyle sikae</i> (GE)	NC027112	80,7	82,2	83,3	83,6	84,4	82,5	82,5	84	82,5	82,2	81,8	81,8	82,5	81,8	82,9	84,4	78,9	81,8	81,1	

