

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

DANIMAR DANILIA LÓPEZ HERNÁNDEZ

ESTUDO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE LARVAS DE DIPLOSTOMOIDEA
(TREMATODA: DIGENEA) TRANSMITIDAS POR MOLUSCOS
DULCIAQUÍCOLAS EM BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL

Belo Horizonte

Fevereiro de 2018

DANIMAR DANILIA LÓPEZ HERNÁNDEZ

ESTUDO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE LARVAS DE DIPLOSTOMOIDEA
(TREMATODA: DIGENEA) TRANSMITIDAS POR MOLUSCOS
DULCIAQUÍCOLAS EM BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Helminologia

Orientador: Dr. Hudson Alves Pinto

Coorientadora: Dra. Élide Mara Leite Rabelo

Belo Horizonte

Fevereiro de 2018

Aos meus pais, meus irmãos e meu sobrinho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Danilo José López Villalba e Maria del Valle Hernández Rodríguez, por sempre me guiar, pelo apoio em cada decisão importante da minha vida e por ter sempre as palavras corretas para cada momento.

A minha irmã Daniela Emperatriz López Hernández, por ser minha segunda mãe, minha amiga incondicional, sempre me dando bons conselhos e me acompanhando, apesar da distância.

Ao professor Hudson Alves Pinto, pela oportunidade de ser sua orientada e por ter compartilhado informações sobre o maravilhoso mundo dos trematódeos. Sou grata por ter sido um amigo e por ter me ajudado nos momentos que eu precisei, acreditando que tudo ia dar certo, inclusive quando não parecia. Agradeço muito a paciência, o entusiasmo e o apoio.

À professora Élide Mara Leite Rabelo, minha coorientadora, pelos conselhos e ajuda. Agradeço ainda por ter disponibilizado seu laboratório para o desenvolvimento da parte molecular deste trabalho.

Ao professor Alan Lane de Melo, pelos conselhos, sugestões e ajuda sempre que foi necessário. Agradeço por ter aberto as portas do seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Sr. Airton Lobo, pela ajuda na montagem das lâminas, pela amizade e a paciência para me ensinar algumas técnicas parasitológicas.

Aos meus companheiros do Laboratório de Biologia de Trematódeos, Jordana Costa Alves de Assis, Eduardo Alberto Pulido Murillo e Nicole Quaresma Gonçalves, pela ajuda constante e amizade.

Aos companheiros do Laboratório de Parasitologia Molecular, Nayara Mendes, Vivian Jordania da Silva, Celi Medeiros e especialmente Luis Fernando Viana Furtado,

por ter me guiado durante o desenvolvimento dos estudos moleculares, além da amizade e os bons momentos.

Aos meus companheiros de turma, em especial Williane Fernanda Siqueira, Guilherme Silva Miranda, Diogo Tavares Cardoso e Ana Carolina Marinho dos Santos, agradeço muito ter me integrado ao grupo, por me ajudar com o idioma, além de me ensinar sobre a linda cultura brasileira. Agradeço pela amizade e ajuda, especialmente nos momentos mais difíceis.

À família Drumond, pelo carinho familiar que sempre é necessário quando estamos longe de casa. Agradeço especialmente a Sra. Maria Lúcia de Melo Drumond por tudo.

A Diego Alejandro Flores Padrón, por acreditar em mim quando nem eu mesma achava que as coisas podiam dar certo. Obrigada pelo apoio de sempre.

A Patrícia Schossler, uma verdadeira amiga que adquiri no Brasil. Muito obrigada por tudo.

Às Sras. Sumara Aparecida Guilherme e Sibeles das Graças Guilherme Abreu, secretárias da Pós-Graduação em Parasitologia, ICB, UFMG, pela ajuda atenciosa sempre que precisei.

Ao professor Ricardo Toshio Fujiwara, pela acolhida gentil e ajuda nos primeiros dias após a minha chegada ao Brasil.

Ao Dr Sean Locke, University of Puerto Rico at Mayagüez, por ter disponibilizado algumas amostras e sequências utilizadas nas análises moleculares.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, pelas aulas maravilhosas e a disposição e ajuda com a língua portuguesa.

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

À Organização de Estados Americanos (OEA) e ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB) pela oportunidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia pelos conhecimentos adquiridos durante estes dois anos, os quais tenho certeza que serão de fundamental importância para a minha vida acadêmica. Obrigada por esta maravilhosa experiência.

À Fundação de Parques Municipais de Belo Horizonte, pela permissão para a realização de coletas malacológicas no Parque Lagoa do Nado.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os trematódeos pertencentes à superfamília Diplostomoidea parasitam, na fase adulta, aves, mamíferos e répteis, possuindo ciclos biológicos complexos, envolvendo moluscos gastrópodes e diferentes grupos de invertebrados e vertebrados como hospedeiros intermediários. No Brasil, embora mais de 100 espécies tenham sido registradas em vertebrados, incluindo espécies de importância para a piscicultura ou potencialmente zoonóticas, a maioria não possui ciclo biológico e moluscos transmissores conhecidos. No presente estudo, estrigeocercárias obtidas de moluscos coletados em coleções aquáticas de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, foram submetidas a estudo morfológico, experimental e molecular. As amostras avaliadas correspondem a larvas previamente coletadas (7 amostras) e provenientes de coletas malacológicas realizadas entre maio de 2016 e maio de 2017 (4 amostras). A amplificação e sequenciamento de região parcial do gene 18S rRNA, da região espaçadora transcrita interna (ITS) e de um fragmento do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI) foram realizadas. As sequências obtidas foram comparadas com outras disponíveis no GenBank. Além disso, visando a obtenção de outros estágios evolutivos para identificação taxonômica, as estrigeocercárias obtidas durante as novas coletas malacológicas foram utilizadas para a realização de infecções experimentais envolvendo peixes (*Poecilia reticulata*) e moluscos (*Biomphalaria glabrata*) como segundos hospedeiros intermediários, sendo metacercárias obtidas utilizadas para a infecção de aves (*Gallus gallus domesticus*) e mamíferos (*Mus musculus*). A utilização da taxonomia integrativa no estudo das estrigeocercárias avaliadas possibilitou a identificação de 6 espécies pertencentes a superfamília Diplostomoidea. Entre os membros da família Diplostomidae, duas espécies, *Austrodiplostomum compactum* e *Hysteromorpha* sp., foram encontradas em *Biomphalaria straminea*. As sequências nucleotídicas obtidas para a primeira espécie foram semelhantes as disponíveis para isolados do parasito oriundos dos EUA, Brasil, México e Peru. Em relação a *Hysteromorpha* sp., embora a morfologia das cercárias e das metacercárias obtidas experimentalmente em *P. reticulata*, associada as sequências obtidas pelos marcadores nucleares, sugerissem coespecificidade com *Hysteromorpha triloba*, diferenças significativas foram encontradas entre sequências COI de amostras do Brasil e isolados de *H. triloba* do Canadá e Itália, sugerindo a ocorrência de espécies crípticas neste

gênero. Cercárias de *Posthodiplostomum nanum* foram encontradas em *Gundlachia ticaga*, sendo metacercárias e um parasito adulto obtidos, respectivamente, em *P. reticulata* e camundongo infectados experimentalmente. Os dados moleculares e filogenéticos revelaram que, embora *P. nanum* se agrupe com algumas espécies do gênero oriundos América do Norte e Europa, as diferenças moleculares são significativas em relação à maioria dos isolados cogenêricos. Três espécies pertencentes a família Strigeidae foram encontradas também em *B. straminea*. Entre estas, *Cotylurus* sp., apresentaram sequências idênticas as obtidas para metacercárias do tipo *Tetracocyle* encontradas em *B. straminea* naturalmente infectadas. Uma outra cercária, identificada como *Apharyngostrigea* sp., possui diferenças moleculares significativas em relação a espécies cogenêricas descritas da América do Norte. Por fim, uma larva identificada como Strigeidae gen. sp., para a qual ensaios experimentais não resultaram em sucesso, não apresentou similaridade com nenhuma das sequências disponíveis para comparação. Os resultados obtidos revelaram novas associações entre moluscos e trematódeos da superfamília Diplostomoidea no Brasil, resultando em um aporte significativo de sequências nucleotídicas para representantes deste grupo de trematódeos.

Palavras chave: cercárias, Diplostomoidea, moluscos, sequências, taxonomia, moleculares.

ABSTRACT

The trematodes belonging to the superfamily Diplostomoidea parasitize, in the adult stage, birds, mammals and reptiles. These helminths have complex life cycles, involving gastropods and different groups of invertebrates and vertebrates as intermediate hosts. In Brazil, although more than 100 species were reported in vertebrates, including species with importance to pisciculture or potentially zoonotic, most of them present life cycle and transmitting molluscs unknown. In the present study, strigeid cercariae obtained in molluscs collected in aquatic collections from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, were submitted to morphological, experimental and molecular studies. The samples that were evaluated correspond to larvae previously collected (7 samples) and other obtained during malacological surveys carried out between May 2016 and May 2017 (4 samples). The amplification and sequencing of a partial region of 18S rRNA gene, the complete internal transcriptional spacer region (ITS), and a fragment of the gene cytochrome c oxidase I subunit (COI) were performed. The sequences obtained were compared with others available on GenBank . In addition, in order to obtain other developmental stages for taxonomic identification, the strigeid cercariae obtained during the new malacological collections were used to perform experimental infections of fish (*Poecilia reticulata*) and molluscs (*Biomphalaria glabrata*). In some cases, metacercariae obtained were used for the infection of birds (*Gallus gallus domesticus*) and mammals (*Mus musculus*). The use of the integrative taxonomy in the study of the strigeid cercariae evaluated allowed the identification of 6 species belonging to the superfamily Diplostomoidea. Among the members of the family Diplostomidae, two species, *Austrodiplostomum compactum* and *Hysteromorpha* sp., were found in *Biomphalaria straminea*. The nucleotide sequences obtained for the first species were similar to those available for isolates of the parasite from the USA, Brazil, Mexico and Peru. In relation to *Hysteromorpha* sp., although the morphology of cercariae and metacercariae obtained experimentally in *P. reticulata*, associated with the sequences obtained by nuclear markers, suggested coespecificity with *Hysteromorpha triloba*, significant differences were found between COI sequences of the samples from Brazil and isolates of *H. triloba* from Canada and Italy, suggesting the occurrence of cryptic species in this genus. Cercariae of *Posthodiplostomum nanum* were found in *Gundlachia ticaga* and metacercariae and one adult parasite were obtained experimentally in *P. reticulata* and mouse, respectively. The molecular and

phylogenetic data revealed that *P. nanum* groups with some species of the genus from North America and Europe, but the differences found are significant in relation to most of the cogenetic isolates. Three species belonging to the family Strigeidae were also found in *B. straminea*. Among these, cercariae of *Cotylurus* sp. presented sequences identical to those obtained for metacercariae of the type *Tetracholyle* found in *B. straminea* naturally infected. Another cercaria, identified as *Apharyngostrigea* sp., differs molecularly from congeneric species described from North America. Finally, a larva identified as Strigeidae gen. sp., for which experimental infection assays were unsuccessful, showed no significant similarity with sequences available for comparison. The results obtained revealed new associations between molluscs and trematodes of the superfamily Diplostomoidea in Brazil, resulting in a significant addition of nucleotide sequences to representatives of this group of trematodes.

Key-words: cercariae, Diplostomoidea, molecular sequences, snails, taxonomy.

RESUMEN

Los tremátodos pertenecientes a la superfamilia Diplostomoidea parasitan, en la fase adulta, aves, mamíferos y reptiles. Estos helmintos poseen ciclos biológicos complejos, envolviendo, moluscos gasterópodos y diferentes grupos de invertebrados y vertebrados como hospederos intermediarios. En Brasil, a pesar de que 100 especies ya han sido registradas en vertebrados, incluyendo especies de importancia para la piscicultura o potencialmente zoonóticas, la mayoría no posee ciclo biológico y moluscos transmisores conocidos. En el presente estudio, estrigeocercarias obtenidas de moluscos colectados en colecciones acuáticas de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, fueron sometidas a un estudio morfológico, experimental y molecular. Las muestras evaluadas corresponden a larvas previamente colectadas (7 muestras) y provenientes de colectas malacológicas realizadas entre mayo de 2016 y mayo de 2017 (4 muestras). La amplificación y secuenciación de la región parcial del gen 18S rRNA, de la región espaciadora transcripta interna (ITS) y de un fragmento del gen citocromo c oxidasa subunidad I (COI) fueron realizadas. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con otras disponibles en el GenBank . Además, intentando la obtención de otros estadios evolutivos para la identificación taxonómica, las estrigeocercarias obtenidas durante las nuevas colectas malacológicas fueron utilizadas para la realización de infecciones experimentales envolviendo peces (*Poecilia reticulata*) y moluscos (*Biomphalaria glabrata*) como segundos hospederos intermediarios, siendo las metacercarias obtenidas utilizadas para la infección de aves (*Gallus gallus domesticus*) y mamíferos (*Mus musculus*). La utilización de la taxonomía integrativa realizada en el estudio de las estrigeocercarias evaluadas, permitió la identificación de 6 especies pertenecientes a la superfamilia Diplostomoidea. Entre los miembros de la familia Diplostomidae, dos especies, *Austrodiplostomum compactum* y *Hysteromorpha* sp. fueron encontradas en *Biomphalaria straminea*. Las secuencias nucleotídicas obtenidas para la primera especie fueron semejantes con las disponibles para los aislados oriundos de los Estados Unidos, Brasil, México y Perú. En relación a *Hysteromorpha* sp., a pesar de la morfología de las cercarias y metacercarias obtenidas experimentalmente de *P. reticulata*, asociada a las secuencias obtenidas por los marcadores nucleares, sugiriesen co-especificidad con *Hysteromorpha triloba*, diferencias significativas fueron encontradas entre secuencias de COI de las muestras de Brasil y los aislados de *H. triloba* de Canadá y Italia,

sugiriendo la ocurrencia de especies crípticas en este género. Cercarias de *Posthodiplostomum nanum*, fueron encontradas en *Gundlachia ticaga*, siendo metacercarias y un parásito adulto obtenidos, respectivamente, en *P. reticulata* y un camundongo infectados experimentalmente. Los datos moleculares y filogenéticos revelaron que, aunque *P. nanum* agrupa con algunas especies del género oriundos de Norteamérica y Europa, las diferencias moleculares son significativas en relación a la mayoría de los aislados congénicos. Tres especies pertenecientes a la familia Strigeidae fueron encontradas también en *B. straminea*. Entre estas, *Cotylurus* sp., presentaron secuencias idénticas a las obtenidas para metacercarias del tipo *Tetracotyle* encontradas en *B. straminea* naturalmente infectadas. Otra cercaria, identificada como *Apharyngostrigea* sp., posee diferencias moleculares significativas en relación a las especies congénicas descritas en Norteamérica. Finalmente, una larva identificada como Strigeidae gen. sp., para la cual ensayos experimentales no tuvieron éxito, no presentó similitud con ninguna de las secuencias disponibles para comparación. Los resultados obtenidos revelaron nuevas interacciones biológicas entre moluscos y tremátodos de la superfamilia Diplostomoidea en Brasil, resultando en un aporte significativo de secuencias nucleotídicas para representantes de este grupo de tremátodos.

Palabras clave: cercarias, Diplostomoidea, moluscos, secuencias moleculares, taxonomía.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- Ciclo biológico geral de trematódeos (modificado de COMBES *et al.*, 2002)..... 27
- FIGURA 2- Ciclos biológicos de Diplostomoidea Poirier, 1886. **a** Representação do ciclo de vida mais comum verificado nos membros desta superfamília. **b** Variações nos ciclos de vida de Diplostomoideaparasitos, quando adultos, de diferentes grupos de vertebrados: aves (I-V), mamíferos (incluindo cetáceos, VI-IX) e répteis (incluindo crocodilianos, serpentes e quelônios X-XIII). Dependendo do parasito, as cercárias infectam peixes (X), anfíbios (XI), anelídeos (XII) ou moluscos (XIII) como segundo hospedeiro intermediário, podendo haver a presença de hospedeiro paratênico (V, IX). (modificado de BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017)..... 31
- FIGURA 3- Representação esquemática geral de larvas da superfamília Diplostomoidea, evidenciando as principais estruturas morfológicas (modificado de OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1992)..... 32
- FIGURA 4- Tipos de metacercárias presentes em espécies pertencentes à superfamília Diplostomoidea. **a-c** *Diplostomulum*, **d.** *Neascus*, **e.** *Prohemistomulum*. **f.** *Tetracotyle* (Modificado de NIEWANDOSKA, 2002a). 33
- FIGURA 5- Espécies de trematódeos da superfamília Diplostomoidea com ciclos de vida elucidados na América Latina. **a.** *Mesostephanus odhneri*, **b.** *Austrodiplostomum compactum*, **c.** *Austrodiplostomum mordax*, **d.** *Posthodiplostomum nanum*, **e.** *Posthodiplostomum* sp., **f.** *Apharyngostrigea simplex*, **g.** *Apharyngostrigea* sp. **h.** *Australapatemon bdello cystis*, **i.** *Australapatemon magnacetabulum*, **j.** *Cotylurus lutzi*. 37
- FIGURA 6- Cercárias de Diplostomoidea encontradas em moluscos na América Latina, mas não associadas aos respectivos adultos I. **a.** *Furcocercaria* sp. (cf. *Apatemon* (*Australapatemon*), **b.** *Furcocercaria* sp. (cf. *Tylodelphys*), **c.** *Furcocercaria* sp. I, **d.** *Furcocercaria* sp. II, **e.** *Furcocercaria* sp. III, **f.** *Furcocercaria* sp. IV, **g.** *Furcocercaria* sp. V, **h.** *Furcocercaria* sp. VI, **i.** *Furcocercaria* sp. VII, **j.** *Furcocercaria* sp. VIII, **k.**

<i>Furcocercaria</i> sp. X, l. <i>Furcocercaria</i> sp. XIII (aff. <i>Strigea</i> sp.), m. <i>Furcocercaria</i> sp. XIV, n. <i>Furcocercaria</i> sp. XV, o. <i>Furcocercaria</i> sp. XVII, p. <i>Furcocercaria</i> XIX, q. <i>Furcocercaria</i> XX.....	43
---	----

FIGURA 7- Cercárias de Diplostomoidea encontradas em moluscos na América Latina mas ainda não associadas aos respectivos adultos II. **a.** *Furcocercaria* sp. XVII, **b.** *Apharyngostrigea* sp., **c.** *Cercaria amplicoecata*, **d.** *Cercaria caratinguensis*, **e.** *Cercaria conchicola*, **f.** *Cercaria crassipira*, **g.** *Cercaria guaibensis* 1, **h.** *Cercaria guaibensis* 5, **i.** *Cercaria gyrinipeta*, **j.** *Cercaria mediohyalina*, **k.** *Cercaria molluscipeta*, **l.** *Cercaria piscipeta*, **m.** *Cercaria zygochorde*, **n.** Diplostomidae, **o.** *Furcocercaria* (Ocelada/longifurcada).....

	44
--	----

FIGURA 8- Cercárias de Diplostomoidea encontradas em moluscos na América Latina, mas ainda não associadas aos respectivos adultos III. **a.** *Furcocercaria* (sem ocelos/longifurcada), **b.** *Furcocercaria* 1, **c.** Strigeidae, **d.** *Strigea-cercaria*, **e.** Strigeidae/Diplostomidae 1, **f.** Strigeidae/Diplostomidae 2, **g.** Strigeidae/Diplostomidae 3, **h.** *Apharyngostrigea*, **i.** *Tylodelphys* sp., **j.** *Cercaria caribbea* LVIII, **k.** *Cercaria caribbea* LI, **l.** *Cercaria neotropicalis*, **m.** *Furcocercaria* 1, **n.** *Furcocercaria* 2, **o.** *Furcocercaria* 3, **p.** *Furcocercaria* 4, **q.** *Furcocercaria* 5.....

	45
--	----

FIGURA 9- Cercárias de Diplostomoidea encontradas em moluscos na América Latina, mas ainda não associadas aos respectivos adultos IV. **a.** *Cercaria allotropicalis*, **b.** *Cercaria cornuaretis*, **c.** *Cercaria criollissima*, **d.** *Cercaria cumanacoensis*, **e.** *Cercaria ghaziaporzanae*, **f.** *Cercaria hinchicauda*, **g.** *Cercaria husicauda*, **h.** *Cercaria laeovissimus*, **i.** *Cercaria manzanarensis*, **j.** *Cercaria monagasica*, **k.** *Cercaria neorientalis*, **l.** *Cercaria patoica*.

	46
--	----

FIGURA 10- Vista aérea dos locais de coleta de moluscos para a pesquisa de larvas de Diplostomoidea em Belo Horizonte, Minas Gerais.....

	52
--	----

FIGURA 11- Esquema representativo do fluxo de análise molecular de amostras de Diplostomoidea avaliadas no presente estudo.

	58
--	----

FIGURA 12- Regiões de eletroferogramas de amostras de Diplostomoidea apresentando caudas poli-nucleotídicas **a.** Sequenciamento no sentido “Forward”, evidenciando efeito da presença de cauda poli-T. **b.** Sequenciamento no sentido “Reverse” com cauda Poli-A. **c.** Sequenciamento no sentido “Forward” por obtido por clonagem. **d.** Sequenciamento no sentido “Reverse” obtido por clonagem..... 69

FIGURA 13- Árvore filogenética inferida por Inferência Bayesiana (IB) a partir de sequências parciais do gene nuclear 18S rRNA das amostras da família Diplostomidae obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank. O suporte dos nós é fornecido pelos valores de bootstrap obtido por Máxima Verossimilhança (MV) e probabilidade posterior obtidos por IB (MV/IB). Valores <50 e <0,95 são representados como -. Valores não obtidos por MV são representados por *. 74

FIGURA 14- Árvore filogenética inferida por Inferência Bayesiana (IB) a partir de sequências da região transcrita espaçadora interna (ITS) das amostras da família Diplostomidae obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank. O suporte dos nós é fornecido pelos valores de bootstrap obtido por Máxima Verossimilhança (MV) e probabilidade posterior obtidos por IB (MV/IB). Valores <50 e <0,95 são representados como -. Valores não obtidos por MV são representados por *. 75

FIGURA 15- Árvore filogenética inferida por Inferência Bayesiana (IB) a partir de sequências do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI) das amostras da família Diplostomidae obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank. O suporte dos nós é fornecido pelos valores de bootstrap obtido por Máxima Verossimilhança (MV) e probabilidade posterior obtidos por IB (MV/IB). Valores <0,95 e <50 são representados como -. Valores não obtidos por MV são representados por *. 76

FIGURA 16- *Hsyteromorpha* sp. **(a)** Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* naturalmente infectada coletada na Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **(b)** Detalhe do corpo cercariano. **(c)** Metacercária obtida experimentalmente em

Poecilia reticulata aos 70 dias de infecção. Escalas: 100 µm (a), 25 µm (b), 200 µm (c).
..... 78

FIGURA 17- *Posthodiplostomum nanum*: (a) Cercária emergida de *Gundlachia ticaga* coletada no Parque Lagoa do Nado, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. (b) Detalhe do corpo da cercária. (c) Metacercária recuperada na cavidade corporal de *Poecilia reticulata* infetado experimentalmente. (d) Parasito adulto recuperado em camundongo experimentalmente infectado. Escalas: 100 µm (a), 50 µm (b) e 200 µm (c, d)..... 86

FIGURA 18- *Austrodiplostomum compactum* (a) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* naturalmente infectada coletada na Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. No canto superior direito encontra-se a larva em posição de repouso). (b) Detalhe do corpo da cercária. Escalas: 200µm (a), 50 µm (b). 97

FIGURA 19- Árvore filogenética inferida por Inferência Bayesiana (IB) a partir de sequências do gene 18S rRNA de amostras da família Strigeidae obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank. O suporte dos nós é fornecido pelos valores de bootstrap obtido por Maxima Verosimilhança (MV) e probabilidade posterior obtidos por IB (MV/IB). Valores <0,95 e <50 são representados como -. Valores não obtidos por MV são representados por *..... 106

FIGURA 20- Árvore filogenética inferida por Inferência Bayesiana (BI) a partir de sequências da região transcrita espaçadora interna (ITS) de amostras da família Strigeidae obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank. O suporte dos nós é fornecido pelos valores de *bootstrap* obtido por Maxima Verosimilhança (MV) e probabilidade posterior obtidos por IB (MV/IB). Valores <50 e <0,95 são representados como -. Valores não obtidos por MV são representados por *.
..... 107

FIGURA 21- Árvore filogenética inferida por Inferência Bayesiana (IB) a partir de sequências do citocromo c oxidase subunidade I (COI) das amostras da família Strigeidae obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank. O suporte dos nós é fornecido pelos valores de bootstrap obtido por Maxima Verosimilhança (MV) e probabilidade posterior obtidos por IB (MV/IB). Valores <50 e

<0,95 são representados como -. Valores não obtidos por MV são representados por *.
..... 108

FIGURA 22- *Cotylurus* sp. (a) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada na Lagoa da Cidade Administrativa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. (b) Detalhe do corpo da cercária. (c) Metacercária encontrada em *Biomphalaria straminea* naturalmente infectada. Escalas: 50 µm. 111

FIGURA 23- Strigeidae gen. sp. (a) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada na Cidade Administrativa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. No canto superior direito encontra-se a larva em posição de repouso. (b) Detalhe do corpo da cercária. Escalas: 100 µm (a), 50 µm (b). 120

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1- Espécies de trematódeos da superfamília Diplostomoidea com ciclos biológicos elucidados na América Latina..... 36
- TABELA 2- Larvas de trematódeos da superfamília Diplostomoidea encontradas em moluscos na América Latina, mas ainda não associadas aos respectivos parasitos adultos..... 38
- TABELA 3- Sequências nucleotídicas obtidas a partir de amostras para espécies de Diplostomoidea presentes na América do Sul. Abreviaturas: EE: estágio evolutivo, M: metacercária, A: adulto..... 47
- TABELA 4- Amostras de trematódeos pertencentes à superfamília Diplostomoidea previamente coletadas e utilizadas para análises morfológica e/ou molecular. Abreviaturas: EE= estágio evolutivo, EMol= Estudo molecular, EMo= estudo morfológico, C= cercária, M= metacercária, A= adulto. 53
- TABELA 5- Primers utilizados para a amplificação de fragmentos dos genes COI, 18S e a região de ITS de amostras de Diplostomoidea encontradas em moluscos dulceaquícolas em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 62
- TABELA 6- Modelos de substituição de nucleotídeos utilizados para a construção das árvores filogenéticas. 63
- TABELA 7- Exemplos de moluscos coletados e infectados por cercárias durante coletas malacológicas realizadas em três coleções aquáticas de Belo Horizonte, MG, entre os meses de maio de 2016 e maio de 2017. Abreviaturas: EST: Estrigeocercaria; OC: Outras cercárias..... 65
- TABELA 8- Dados sobre as sequências parciais dos genes 18s, ITS e COI de trematódeos da família Diplostomidae depositadas no GenBank, utilizadas na construção das árvores filogenéticas. Informações sobre as sequências utilizadas como

outgroup (*Clinostomum* spp.) são também apresentadas. Abreviaturas: C= cercária, M= metacercária, A= adulto, NI= não informado..... 70

TABELA 9- Medidas (em μm) das cercárias de *Hysteromorpha* sp. encontradas em *Biomphalaria straminea* em Belo Horizonte, e dados relatados para larvas de *Hysteromorpha triloba* por outros autores. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura. 79

TABELA 10- Dados morfométricos de metacercárias de *Hysteromorpha* sp. obtidas experimentalmente de *Poecilia reticulata*, e medidas relatadas para *Hysteromorpha triloba* por outros autores. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura. 80

TABELA 11- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene 18S rRNA obtidas para três espécies de trematódeos da família Diplostomidae obtidas no presente trabalho (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank para espécies relacionadas. 82

TABELA 12- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências da região espaçadora transcrita interna (ITS) de *Hysteromorpha* sp. obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank para *Hysteromorpha triloba*, *Diplostomum* spp. e Diplostomidae sp. 83

TABELA 13- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) de *Hysteromorpha* spp. obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de *Diplostomum* spp. disponíveis no GenBank. 84

TABELA 14- Dados morfométricos das cercárias de *Posthodiplostomum nanum* encontradas em *Gundlachia ticaga* em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, e dados relatados por outros autores para *Posthodiplostomum* spp. na América do Sul. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura. 88

TABELA 15- Dados morfométricos de metacercárias de *Posthodiplostomum nanum* obtidas experimentalmente de *Poecilia reticulata* e medidas de *Posthodiplostomum* spp.

relatadas em peixes na América do Sul por diferentes autores. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura..... 89

TABELA 16- Dados morfométricos de *Posthodiplostomum nanum* obtido experimentalmente em camundongos e medidas de *Posthodiplostomum* spp. relatados por diferentes autores na América do Sul. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura. 90

TABELA 17- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências da região espaçadora transcrita interna (ITS) de *Posthodiplostomum nanum* obtidas no presente estudo (em negrito) e dados disponíveis no GenBank para *Posthodiplostomum* spp., *Ornithodiplostomum* spp. e *Mesoophorodiplostomum pricei*. 94

TABELA 18- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene citocromo *c* oxidase (COI) de *Posthodiplostomum nanum* obtidas no presente estudo (em negrito) e dados disponíveis no GenBank para *Posthodiplostomum* spp., *Ornithodiplostomum* spp. e *Mesoophorodiplostomum pricei*. 95

TABELA 19- Dados morfométricos de cercárias de *Austrodiplostomum compactum* encontradas em *Biomphalaria straminea* em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, e dados descritos para *Austrodiplostomum* spp. por outros autores. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura..... 98

TABELA 20- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências da região espaçadora transcrita interna (ITS) de *Austrodiplostomum compactum* obtidas no presente estudo (em negrito) e dados disponíveis no GenBank para outros isolados de *A. compactum* e para *Tylodelphys* spp. 100

TABELA 21- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene citocromo *c* oxidase subunidade I (COI) de *Austrodiplostomum compactum* obtidas no presente estudo (em negrito) e e

dados disponíveis no GenBank para *Austrodiplostomum* spp. e para *Tylodelphys* spp.
..... 101

TABELA 22- Dados das sequências dos genes 18S, ITS e COI de trematódeos da família Strigeidae disponíveis no GenBank utilizadas na construção das árvores filogenéticas. Informações sobre as sequências de espécies de Diplostomidae utilizadas como *outgroup* nas análises filogenéticas são também apresentadas. Abreviaturas: C= cercária, M= metacercária, A= adulto. 104

TABELA 23- Dados morfométricos de cercárias de *Cotylurus* sp. encontradas em *Biomphalaria straminea* em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, e dados relatados para larvas semelhantes por outros autores na América do Sul. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura..... 112

TABELA 24- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-coriçada, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene 18S rRNA obtidas para três espécies de trematódeos da família Strigeidae obtidas no presente trabalho (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank para espécies relacionadas. 115

TABELA 25- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-coriçada, expressa em porcentagem) entre sequências da região espaçadora transcrita interna (ITS) de espécies de Strigeidae obtidas no presente estudo (em negrito) e dados disponíveis no GenBank para espécies relacionadas..... 116

TABELA 26- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-coriçada, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI) de espécies de Strigeidae obtidas no presente estudo (em negrito) e dados disponíveis no GenBank para espécies relacionadas..... 117

TABELA 27- Dados morfométricos de cercárias de Strigeidae gen. sp. encontradas em *Biomphalaria straminea* em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, e dados relatados para larvas semelhantes por outros autores. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura..... 121

LISTA DE ABREVIATURAS

A: Adulto	LT: Lituânia.
AL: Alemanha	M: Metacercária
BG: Bulgária	MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
BM: Biologia molecular	MO: Morfologia.
BR: Brasil	MG: Minas Gerais
CA: Canadá	MV: Máxima verossimilhança
C: Cercária	MX: México
Co: Comprimento	NO: Noruega
COI: Citocromo oxidase	NZ: Nova Zelândia
DNA: Ácido desoxirribonucleico	OC: outras cercárias
DAI: Dias após infecção	PA: Pará
EE: Estágio evolutivo	pb: pares de base
EMo: Estudo morfológico	PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
EMol: Estudo molecular	PEG: Polietilenoglicol
ES: Espanha	PE: Peru
EST: Estrigeocercária	rpm: rotações por minutos
EUA: Estados Unidos da América	rRNA 18S: Subunidade 18 do ácido ribonucleico ribossomal
IB: Inferência bayesiana	RT: República Tcheca
IN: Índia	RU: Reino Unido
IT: Itália	SL: Eslováquia
ITS: Região espaçadora transcrita interna	TZ: Tanzânia
IS: Islândia	
JP: Japão	
L: Largura	

SUMÁRIO

1.1-	Biologia de trematódeos	26
1.2-	Biologia molecular e estudos taxonômicos	28
1.2-	Superfamília Diplostomoidea	29
1.2.1-	Aspectos taxonômicos	29
1.2.2-	Biologia e formas larvais	30
1.2.2-	Importância médica e veterinária.....	33
1.2.4-	Estudos biológicos com larvas de Diplostomoidea	34
1.2.5-	Cercárias de Diplostomoidea na América Latina	35
1.2.6-	Estudos moleculares em espécies de Diplostomoidea.....	47
1. 2.	JUSTIFICATIVA	49
2. 3.	OBJETIVOS	50
3.1-	Objetivo geral	50
3.2-	Objetivos específicos.....	50
3. 4.	MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1-	Amostras estudadas	51
4.1.1-	Amostras previamente coletadas	51
4.1.2-	Amostras obtidas através de novas coletas malacológicas	54
4.1.2.1-	Coleta de moluscos.....	54
4.1.2.2-	Avaliação da infecção por larvas de trematódeos	54
4.2-	Estudos experimentais	55
4.2.1-	Obtenção experimental de metacercárias.....	55
4.2.2-	Infecção experimental de hospedeiros definitivos.....	56
4.3-	Estudo morfológico dos estágios evolutivos	56
4.4-	Estudo molecular	57
4.4.1-	Fixação das cercárias	57
4.4.2-	Extração e quantificação de DNA	57
4.4.3-	Amplificação do DNA	57
4.4.4-	Purificação dos produtos de PCR	59
4.4.4.1-	Purificação por PEG.....	59
4.4.4.2-	Purificação por GFX	60
4.4.5-	Clonagem	60

4.4.5.1-	Ligação, transformação e PCR de colônia	60
4.4.5.2-	Recuperação do DNA plasmidial.....	61
4.4.6-	Sequenciamento de DNA.....	61
4.4.7-	Análises das sequências	63
4. 5.	RESULTADOS	64
5.1-	Coletas de moluscos e infecção por larvas de trematódeos.....	64
5.2-	Espécies de Diplostomoidea identificadas	66
5.2.1-	Família Diplostomidae.....	66
5.2.1.1-	Aspectos gerais.....	66
5.2.1.2-	Dados moleculares: resultados gerais	66
5.2.1.3-	Caracterização das espécies encontradas	77
5.2.1.3.1-	<i>Hysteromorpha</i> sp.	77
5.2.1.3.1.1-	Posição taxonômica	77
5.2.1.3.1.2-	Caracterização morfológica e morfométrica.....	77
.....		78
5.2.1.3.1.3-	Estudos experimentais	79
5.2.1.3.1.4-	Estudos moleculares	81
5.2.1.3.2-	<i>Posthodiplostomum nanum</i> Dubois, 1937	85
5.2.1.3.2.1-	Posição taxonômica	85
5.2.1.3.2.2-	Caracterização morfológica e morfométrica.....	85
.....		86
5.2.1.3.2.3-	Estudos experimentais	87
5.2.1.3.2.4-	Estudos moleculares	92
5.2.1.3.3-	<i>Austrodiplostomum compactum</i> (Lutz, 1928)	96
5.2.1.3.3.1-	Posição taxonômica	96
5.2.1.3.3.2-	Caracterização morfológica e morfométrica.....	96
5.2.1.3.3.3-	Estudos moleculares	99
5.2.2-	Família Strigeidae	102
5.2.2.1-	Aspectos gerais.....	102
5.2.2.2-	Dados moleculares gerais.....	102
5.2.2.3-	Caracterização das espécies encontradas	109
5.2.2.3.1-	<i>Cotylurus</i> sp.....	109
5.2.2.3.1.1-	Posição taxonômica	109

5.2.2.3.1.2- Caracterização morfológica e morfométrica.....	109
5.2.2.3.1.3- Estudos experimentais	110
5.2.2.3.2- Strigeidae gen. sp.....	118
5.2.2.3.2.1- Posição taxonômica	118
5.2.2.3.2.2- Caracterização morfológica e morfométrica.....	118
5.2.2.3.2.3- Estudos experimentais	119
5.2.2.3.2.4- Estudos moleculares	119
5.2.2.3.3.1- Posição taxonômica	122
5.2.2.3.3.2- Caracterização morfológica e morfométrica.....	122
5.2.2.3.3.3- Estudos moleculares	122
5. 5. DISCUSSÃO	124
6. 6. CONCLUSÕES	142
7. 7. REFERÊNCIAS	144

1- INTRODUÇÃO

1.1- Biologia de trematódeos

Os parasitos desempenham funções-chave nos ecossistemas, regulando a abundância ou densidade de populações de hospedeiros, estabilizando as cadeias alimentares e estruturando as comunidades de animais (POULIN & MORAND, 2004). Entre os diversos grupos dos organismos que realizam o parasitismo, encontram-se os helmintos, os quais têm sido utilizados como provas contemporâneas da biodiversidade, podendo ser usados como bioindicadores, já que sua presença ou ausência permite inferir a riqueza de vertebrados e invertebrados em um determinado hábitat (GARDNER & CAMPBELL, 1992; PÉREZ-PONCE DE LEÓN & GARCIA-PRIETO, 2001). Entretanto, a utilização deste tipo de abordagem possui como pré-requisito o conhecimento de aspectos básicos dos ciclos biológicos destes organismos, incluindo os hospedeiros intermediários (quando existentes) e a morfologia dos estágios larvais. Estudos envolvendo a elucidação destes parâmetros podem resultar em novas informações relacionadas à taxonomia, filogenia e patogenia destes parasitos, podendo ter implicações relevantes para a medicina humana e veterinária, bem como para a conservação da biodiversidade.

Os representantes da classe Trematoda pertencentes à subclasse Digena são platelmintos parasitos que apresentam ciclos de vida complexos, com a participação de vários hospedeiros (Figura 1). As formas adultas parasitam quase que exclusivamente vertebrados (hospedeiros definitivos), existindo obrigatoriamente a participação de no mínimo um hospedeiro intermediário, na maioria das vezes moluscos, nos quais ocorre a fase de reprodução assexuada que culmina na produção de formas larvais denominadas cercárias. Um número significativo de digeneos necessitam de segundos hospedeiros intermediários (outro molusco, larva de inseto, crustáceos, peixes ou outro vertebrado), nos quais são formadas metacercárias que são transmitidas passivamente aos hospedeiros definitivos através de uma relação trófica (DAWES, 1968; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1992; COMBES *et al.*, 2002; PINTO & MELO, 2013a).

A taxonomia de trematódeos é baseada na morfologia dos adultos, de modo que a identificação morfológica das formas larvais encontradas em moluscos é extremamente difícil. Visando relacionar os diferentes estágios evolutivos das espécies

de trematódeos, estudos experimentais envolvendo a elucidação do ciclo biológico destes parasitos vêm sendo realizados desde o final do século XIX, sendo cerca de 1350 ciclos biológicos elucidados até o momento (YAMAGUTI, 1975; CRIBB *et al.*, 2003). Além de esclarecer os ciclos de vida dos parasitos, estes estudos proporcionaram a determinação de parâmetros biológicos básicos relacionados à interação parasito-hospedeiro, tanto nos hospedeiros definitivos quanto nos intermediários.

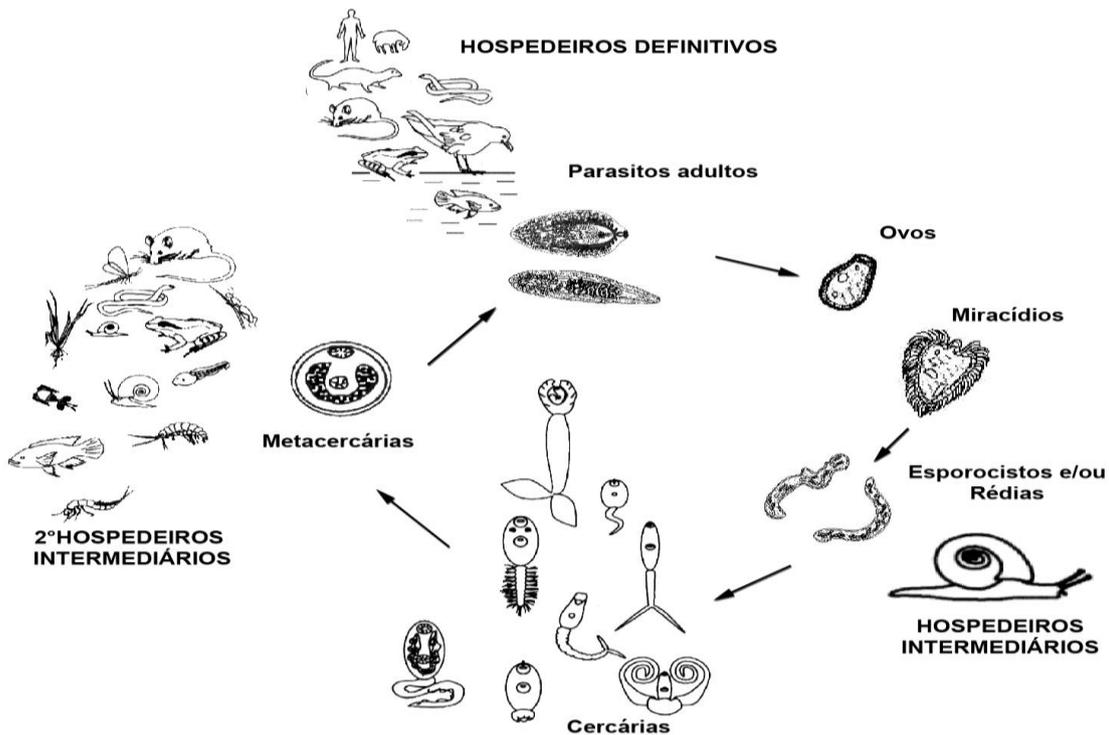


FIGURA 1- Ciclo biológico geral de trematódeos (modificado de COMBES *et al.*, 2002).

No Brasil, mais de 700 espécies de trematódeos foram relatadas em hospedeiros vertebrados, contudo, a maioria destes parasitos ainda permanece com ciclos biológicos desconhecidos. Desde o encontro da cercária de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) por PIRAJÁ-DA-SILVA (1912), dezenas de cercárias foram relatadas em moluscos no Brasil (PINTO & MELO, 2013a). Contudo, estudos experimentais realizados a partir destas larvas ao longo de mais de um século de investigações possibilitaram a identificação de cerca de 50 espécies destes parasitos (PINTO & MELO, 2013b). Nos últimos tempos, um esforço visando ampliar o conhecimento sobre os ciclos biológicos de trematódeos transmitidos por moluscos no país vem sendo realizado através de estudos envolvendo a realização de infecções

experimentais iniciadas a partir de cercárias emergidas de moluscos naturalmente infectados (PINTO *et al.*, 2010a, b, 2012; 2013c, 2015b, 2016), sendo novas interações biológicas entre moluscos e trematódeos elucidadas. Apesar disso, novos estudos são necessários visando ampliar o número de ciclos biológicos de trematódeos existentes no Brasil.

1.2- Biologia molecular e estudos taxonômicos

A associação entre os diferentes estágios evolutivos de Trematoda pode ser complicada, tendo em vista que existem diferentes espécies de peixes, anfíbios e invertebrados envolvidos nos ciclos biológicos e a ocorrência interações específicas com os diferentes hospedeiros definitivos. Estes fatores dificultam a obtenção experimental de parasitos adultos, impossibilitando a identificação, até o nível de espécie, dos estágios larvais encontrados em hospedeiros intermediários. Nesse contexto, a utilização de marcadores moleculares se apresenta como uma ferramenta útil, uma vez que pode permitir a vinculação entre os estágios larvais e os adultos (JOUSSON *et al.*, 1998; OVERSTREET *et al.*, 2002; MOSZCZYNSKA *et al.*, 2009; JENSEN & BULLARD, 2010; CAFFARA *et al.*, 2011; BLASCO-COSTA *et al.*, 2016).

De fato, desde o final do século XX houve um aumento no uso das ferramentas moleculares em diferentes estudos envolvendo trematódeos, não apenas com abordagem taxonômica, mas também na avaliação de aspectos ecológicos (AGUIRRE-MACEDO *et al.*, 2006). Tais estudos envolvem a realização de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) direcionada para a amplificação e o posterior sequenciamento de diferentes marcadores genéticos, seguida da comparação com sequências moleculares disponíveis em bancos de dados (BRANT *et al.*, 2006; LOCKE *et al.*, 2011; FALTÝNKOVÁ *et al.*, 2014; BLASCO-COSTA *et al.*, 2016).

Entre os marcadores atualmente utilizados em estudos de taxonomia molecular encontram-se regiões de genes mitocondriais e ribossomais (LITTLEWOOD *et al.*, 2008; MOSZCZYNSKA *et al.*, 2009; BLASCO-COSTA *et al.*, 2016). A maioria dos estudos envolvendo genes mitocondriais utiliza regiões do gene COI, sendo a região mais utilizada um fragmento de 648 pb proposto para a identificação molecular de animais através da iniciativa denominada “DNA *barcoding*” (HEBERT *et al.*, 2003). Este marcador possibilita a separação de espécies de trematódeos relacionadas,

incluindo espécies crípticas (MOSZCZYNSKA *et al.*, 2009). O uso destes marcadores possui várias vantagens em relação aos nucleares, principalmente devido a maior taxa de mutação (BROWN *et al.*, 1979), responsável por uma maior variação genética (AVISE *et al.*, 1987).

Outro marcador molecular bastante utilizado é a região espaçadora transcrita interna (ITS), que também permite distinguir espécies relacionadas filogeneticamente, embora variação intraespecífica seja raramente encontrada. (NOLLAN & TKACH, 2005; MOSZCZYNSKA *et al.*, 2009). Os dois espaçadores transcritos internos, ITS1 e ITS2, foram amplamente demonstrados como sendo efetivos, separadamente ou em combinação, na investigação taxonômica de espécies de trematódeos (BLASCO-COSTA *et al.*, 2016). Outro gene bastante utilizado é a subunidade pequena do rRNA (SSU ou 18S), sendo uma região de evolução mais lenta (BLASCO-COSTA *et al.*, 2016). A sua utilização é recomendada para inferir relações filogenéticas entre famílias ou grupos de categorias taxonômicas superiores (HILLIS & DAVIS, 1986). Este gene é também um marcador ribossomal bastante utilizado, servindo como um bom controle interno e demonstra uma menor variação nas categorias taxonômicas inferiores, sendo por isso extremamente útil para a identificação de possíveis famílias, especialmente de grupos poucos estudados (BRANT *et al.*, 2006; MOSZCZYNSKA *et al.*, 2009; FIGUEIRA *et al.*, 2014). Atualmente, tem sido recomendada a utilização de associação entre marcadores, sendo preferencialmente, no mínimo, um de origem mitocondrial e outro de origem nuclear (BLASCO-COSTA *et al.*, 2016).

Na América do Sul, apenas recentemente ferramentas moleculares começaram a ser utilizadas na identificação de trematódeos, tanto de adultos (MAGALHÃES *et al.*, 2004; JANNOTTI-PASSOS *et al.* 2006; MUÑOZ *et al.*, 2012; FIGUEIRA *et al.*, 2014; CREMONTE *et al.*, 2015) quanto de estágios larvais encontradas em hospedeiros intermediários (IWAGAMI *et al.*, 2003; MARTORELLI *et al.*, 2012; DAVIES *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2014, 2015 a,b; 2016, 2017; ACOSTA *et al.*, 2016; BORGES *et al.*, 2017).

1.2- Superfamília Diplostomoidea

1.2.1- Aspectos taxonômicos

Entre os principais grupos de trematódeos encontram-se os membros da

superfamília Diplostomoidea Poirier, 1886, parasitos de mamíferos, aves e répteis. As mais de 250 espécies destes parasitos estão distribuídas atualmente em 6 famílias: Cyathocotylidae Mühling, 1898, Brauninidae Wolffügel, 1903, Bolbocephalodidae Strand, 1935, Diplostomidae Poirier, 1886, Protodiplostomidae Dubois, 1936 e Strigeidae Railliet, 1919 (NIEWIADOMSKA, 2002a; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017). Morfologicamente, este grupo diferencia-se de outros trematódeos por possuir um órgão tribocítico, estrutura semelhante à uma ventosa, localizado ventralmente na linha mediana do corpo. Esta estrutura, que apresenta funções tanto adesiva quanto digestiva, possui glândulas proteolíticas que estão associadas a digestão de células epiteliais da mucosa intestinal do hospedeiro (DAWES, 1968; TIESZEN *et al.*, 1974; NIEWIADOMSKA, 2002a).

Na América Latina, uma diversidade de representantes de Diplostomoidea, composta por 110 espécies pertencentes às famílias Brauninidae (1 espécie), Cyathocotylidae (3 espécies), Diplostomidae (51 espécies), Proterodiplostomidae (17 espécies), Strigeidae (38 espécies), foi descrita em diferentes espécies de aves, mamíferos e répteis (compilado por FERNANDES & KOHN, 2014; FERNANDES *et al.*, 2015). Destas espécies, 72 já foram relatadas em diferentes espécies de vertebrados no Brasil (COHEN *et al.*, 2016). Apesar desta diversidade, a maior parte dos ciclos biológicos e moluscos transmissores destes parasitos permanecem ainda desconhecidos.

1.2.2- Biologia e formas larvais

O ciclo de vida dos representantes da superfamília Diplostomoidea é muito complexo, podendo envolver até 4 hospedeiros (Figura 2). Na maioria das espécies é verificado o envolvimento de um gastrópode de água doce, no qual ocorre a fase de reprodução assexuada, e um segundo hospedeiro intermediário, que pode ser, dependendo da espécie do parasito, um peixe, anfíbio, molusco, anelídeo ou invertebrados de outros grupos (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1992; CHAPPELL, 1995; NIEWIADOMSKA, 2002a).

Os parasitos adultos pertencentes a esta superfamília eliminam ovos imaturos através das fezes os quais contaminam os ambientes aquáticos, onde ocorrerá a formação e eclosão de miracídios que nadam ativamente e penetram o molusco hospedeiro intermediário (BOM-TORRIJOS *et al.*, 2016). Em condições experimentais, os ovos destes parasitos podem permanecer, no escuro e a 8° C, viáveis por 11 meses ou

mais, sendo o desenvolvimento do miracídio verificado rapidamente após incubação a temperatura ambiente (BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017). O miracídio possui como característica principal a presença de ocelos pigmentados (HENDRICKSON, 1986) e pode permanecer dentro do ovo por vários dias movimentando-se ativamente (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1973). A incubação obrigatória dos ovos antes da liberação do miracídio foi interpretada como uma adaptação à estabilidade biótica de habitats de água doce (GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003), onde os Diplostomoidea se tornaram diversos.

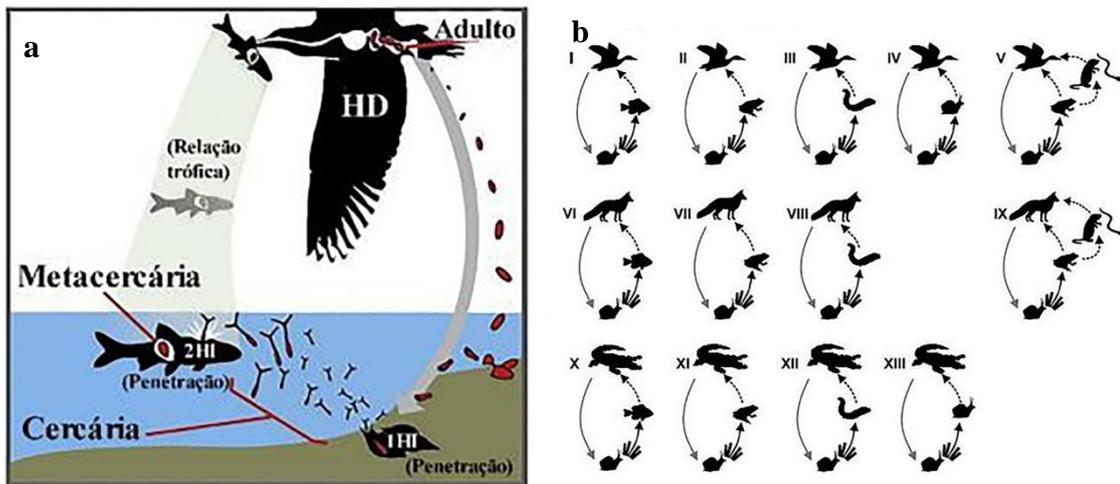


FIGURA 2- Ciclos biológicos de Diplostomoidea Poirier, 1886. **a** Representação do ciclo de vida mais comum verificado nos membros desta superfamília. **b** Variações nos ciclos de vida de Diplostomoideaparasitos, quando adultos, de diferentes grupos de vertebrados: aves (I-V), mamíferos (incluindo cetáceos, VI-IX) e répteis (incluindo crocilianos, serpentes e quelônios X-XIII). Dependendo do parasito, as cercárias infectam peixes (X), anfíbios (XI), anelídeos (XII) ou moluscos (XIII) como segundo hospedeiro intermediário, podendo haver a presença de hospedeiro paratênico (V, IX). (modificado de BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017)

Quanto aos estágios larvais encontrados nos moluscos, após a infecção ativa destes por miracídios, há a formação de esporocistos que produzem furcocercárias pertencentes ao tipo estrigeocercária. Estas são larvas longifurcadas com morfologia variável, dependendo da espécie. Características como a disposição das glândulas de penetração, espinhos do tegumento, número e distribuição de cerdas, fórmula do sistema excretor (Figura 3), podem algumas vezes auxiliar na identificação das famílias e gêneros (DAWES, 1968; DUBOIS, 1970a; NIEWIADOMSKA, 2002a).

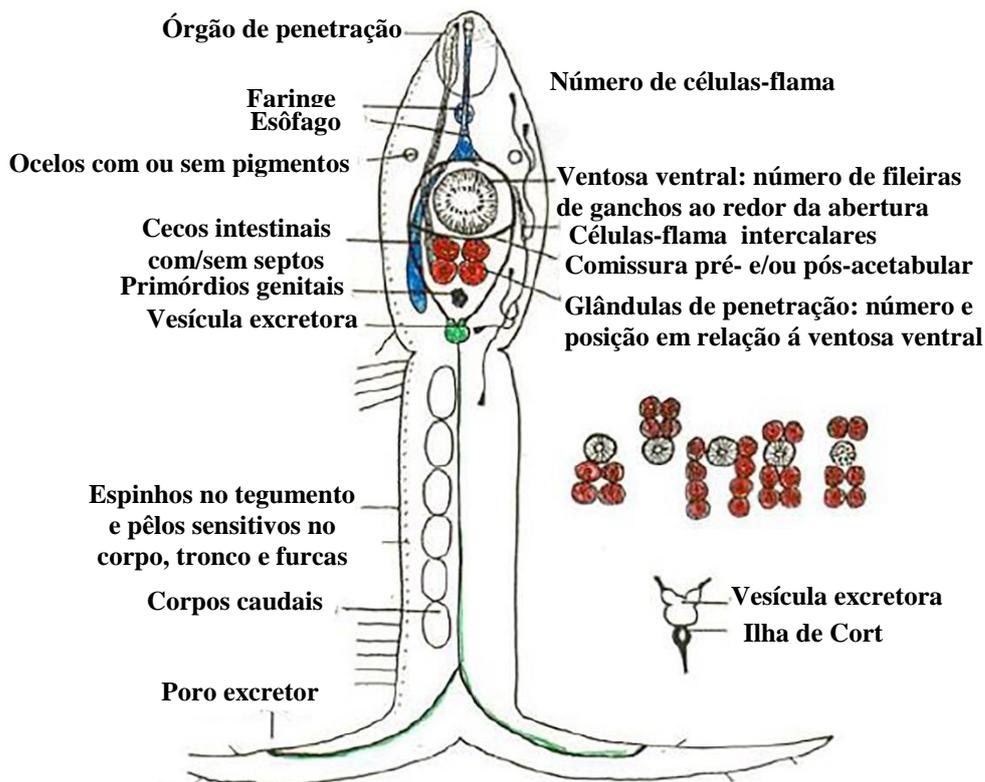


FIGURA 3- Representação esquemática geral de larvas da superfamília Diplostomoidea, evidenciando as principais estruturas morfológicas (modificado de OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1992).

No segundo hospedeiro intermediário são formadas metacercárias, que dependendo da morfologia geral e estrutura da vesícula excretora, podem ser denominadas de *Diplostomulum* Brandes, 1892, *Tetracotyle* De Fillipi, 1895, *Neascus* Hughes, 1927, *Prohemistomulum* Ciurea, 1933 e *Neodiplostomulum* Dubois, 1938 (NIEWIADOMSKA, 2002a) (Figura 4). A localização destes diferentes morfotipos de metacercárias nos órgãos dos hospedeiros intermediários vai depender da espécie de parasito. Por exemplo, espécies de *Diplostomum* Von Nordmann, 1832 são encontradas geralmente em olhos, cérebro e cordão espinhal de peixes e anfíbios (DAWES, 1968; OVERSTREET & CURRAN, 2004).

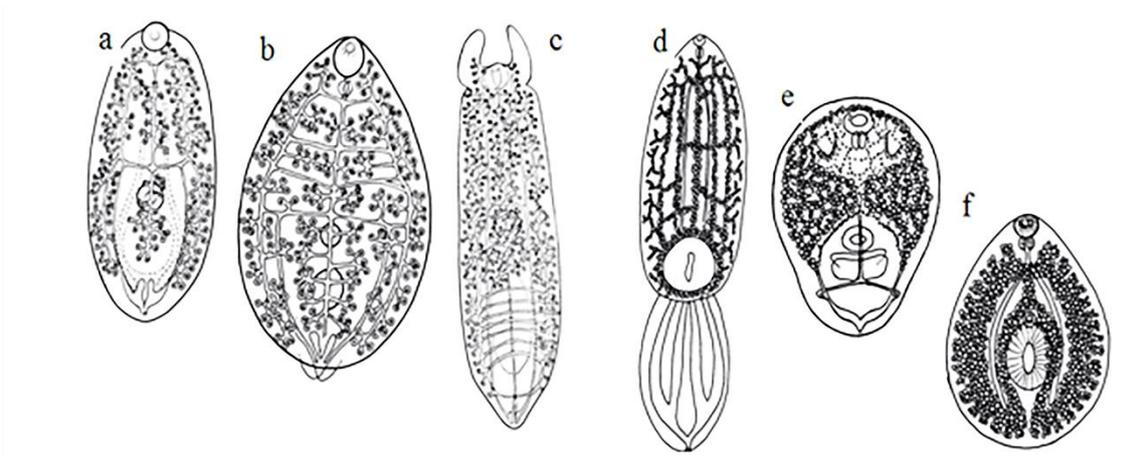


FIGURA 4- Tipos de metacercárias presentes em espécies pertencentes à superfamília Diplostomoidea. **a-c** *Diplostomulum*, **d.** *Neascus*, **e.** *Prohemistomulum*. **f.** *Tetracotyle* (Modificado de NIEWANDOSKA, 2002a).

1.2.2-Importância médica e veterinária

O estudo dos representantes da superfamília Diplostomoidea se justifica pela importância médica e veterinária dos mesmos. Do ponto de vista médico, casos humanos da infecção por *Alaria* spp. foram relatados na Europa (FREEMAN *et al.*, 1976; FERNANDES *et al.*, 1976; MÖHL *et al.*, 2009). Os hospedeiros definitivos destes trematódeos geralmente são canídeos e as formas infectantes (mesocercárias) são relatadas em animais domésticos e silvestres, incluindo javalis (hospedeiro paratênico) (PORTIER *et al.*, 2011) e anfíbios (hospedeiros intermediários), espécies que podem ser destinadas ao consumo humano. A patologia relatada nos casos de alaríose incluem danos aos órgãos abdominais, olhos, músculo somático e tecido subcutâneo (FREEMAN *et al.*, 1976; MÖHL *et al.*, 2009). No Brasil, apesar de haver relatos de *Alaria* sp., *A. alata* (Goeze, 1782), *A. clathrata* (Diesing, 1850) e *A. pseudoclathrata* (Krause, 1914) em mamíferos silvestres [*Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766), *Lycalopex gymnocercus* Fischer, 1814, *Procyon cancrivorus* (Cuvier, 1798) e *Ptenoura brasiliensis* (Zimmermann, 1780)] (compilado por FERNANDES *et al.*, 2015; GRESSLER *et al.*, 2016) não existem ainda casos em humanos. Uma outra espécie do grupo, *Neodiplostomum seoulensis* (Seo, Rim & Lee, 1964) (= *Fibricola seoulensis*) foi relatada em humanos na Coreia, onde os casos estão associados a ingestão de cobras infectadas (SEO *et al.*, 1982; HONG *et al.*, 1984; 1986).

Por outro lado, uma grande diversidade de representantes desta superfamília

possui peixes como hospedeiros intermediários, nos quais podem causar doenças resultantes da presença de metacercárias. Entre estes, algumas espécies do gênero *Diplostomum* podem ocasionar lesões nos olhos como catarata, exoftalmia e em alguns casos destruição do globo ocular e cegueira. Outra enfermidade muito frequente é a doença dos pontos pretos, que é geralmente causada por algumas espécies dos gêneros *Hysteromorpha* Lutz, 1931, *Uvulifer* Dubois, 1988 e *Posthodiplostomum* Dubois, 1936. As alterações patológicas causadas nos peixes estão relacionadas geralmente com danos mecânicos, hemorragias e infecções secundárias, produzidas pelas metacercárias encistadas no tecido, que além de causar danos ao peixe, fazem com que estes apresentem um aspecto repugnante, fazendo que seja rejeitado pelos consumidores (LANE & MORRIS, 2000).

1.2.4- Estudos biológicos com larvas de Diplostomoidea

Alguns trabalhos demonstraram a capacidade de alguns parasitos da superfamília Diplostomoidea de produzirem mudanças de comportamento nos hospedeiros intermediários, o que vem sendo discutido como uma estratégia de manipulação parasitária. ONDRAČKOVÁ *et al.* (2006) realizaram experimentos de infecção de peixes para analisar a relação entre a presença de larvas de *Posthodiplostomum cuticola* (Nordmann, 1832) e a taxa de predação destes vertebrados. Os resultados obtidos demonstraram que mudanças de comportamento são de fato produzidas e que não são necessárias elevadas intensidades de infecção para que aconteçam. Este tipo de manipulação parasitária foi também descrita em peixes parasitados por metacercárias de *Diplostomum* spp. (SEPPÄLÄ *et al.*, 2004; 2005; 2006; 2011; KARVONEN & SEPPÄLÄ, 2008), sendo discutido que a redução da visão é o mecanismo envolvido na maior suscetibilidade aos predadores. Similarmente, CORRÊA *et al.* (2013) estudaram, no Brasil, o comportamento de *Hoplis malabaricus* (Bloch, 1794) infectados por larvas de *Austrodiplostomum* sp., tendo sido verificado que os peixes que apresentavam uma maior intensidade de infecção na cavidade craniana tinham uma natação errática, enquanto os espécimes que apresentavam baixa intensidade de infecção, não demonstravam alterações comportamentais.

Outro tipo de fenômeno interessante descrito em representantes desta superfamília é a transmissão transmamária. Em estudos realizados em primatas e gatos infectados experimentalmente por *Alaria marcianae* (La Rue, 1917) foi confirmado a

presença de larvas (mesocercárias) do parasito nas glândulas mamárias das fêmeas. Além disso, a amamentação de filhotes resultou na transmissão do parasito (SHOOP & CORKUM, 1984; 1987; SHOOP *et al.*, 1990). Segundo TAKEUCHI-STORM *et al.* (2015) a presença de larvas destes parasitos em carnívoros pode indicar potencial zoonótico, especialmente na Ásia, onde a ingestão de carne destes animais é frequente.

Um outro fenômeno interessante foi verificado em estudos que avaliaram a coinfeção de *B. glabrata* por *Cotylurus lutzi* Basch, 1969 e *S. mansoni*, sendo demonstrado que o desenvolvimento deste último parasito pode ser afetado pela presença de larvas de estrigeídeos, o que foi discutido no passado como uma possível forma de controle biológico da esquistossomose (BASCH *et al.*, 1969; BASCH, 1970). Do ponto de vista epidemiológico, é importante mencionar que estrigeocercárias podem ser confundidas com as cercárias de *S. mansoni*, podendo resultar em erros na identificação de novas áreas de transmissão de esquistossomose.

1.2.5- Cercárias de Diplostomoidea na América Latina

Desde o início do século XX, larvas de trematódeos do tipo estrigeocercária foram descritas infectando moluscos na América Latina. Estudos experimentais realizados a partir de larvas encontradas em moluscos coletados em alguns países (Argentina, Brasil, Guadalupe, México e Venezuela) possibilitaram a elucidação do ciclo biológico de 12 espécies pertencentes a 3 famílias de Diplostomoidea (Tabela 1). Além destas espécies, 31 larvas de Diplostomoidea encontradas em moluscos na América Latina foram descritas como pertencentes ao gênero coletivo *Cercaria* Muller, 1774, 33 como *Furcocercaria* Lamark, 1815, ou identificadas em nível de família (Tabela 2). Estas larvas foram relatadas em 31 diferentes espécies de moluscos, principalmente na Venezuela, Argentina e Brasil.

No Brasil, Adolpho Lutz foi quem primeiro estudou larvas destes parasitos, elucidando o ciclo biológico de algumas espécies (LUTZ, 1929; 1931; 1933). Posteriormente, vários outros autores encontraram larvas de representantes destas famílias em moluscos no país. Apesar destas interações previamente elucidadas, a maioria das larvas encontradas por diferentes autores não foram ainda associadas aos respectivos adultos. É importante mencionar que a maior parte destes estudos prévios foram realizados em moluscos vetores da esquistossomose.

TABELA 1- Espécies de trematódeos da superfamília Diplostomoidea com ciclos biológicos elucidados na América Latina.

Espécie	Molusco	Figura Nº 5	Localidade	Referência
Cyathocotylidae				
<i>Mesostephanus odhneri</i> (Travassos <i>et al.</i> , 1924)	<i>Potamides</i> sp.	a	Brasil	Lutz, 1933; Dubois, 1970a
Diplostomidae				
<i>Austrodiplostomum compactum</i> (Lutz, 1928)	<i>Biomphalaria straminea</i> , <i>B. glabrata</i>	b	Brasil	Pinto & Melo, 2013b
	<i>Biomphalaria prona</i>		Venezuela	Ostrowski de Núñez, 1982
	<i>Biomphalaria cf. havanensis</i>		México	Violante-González <i>et al.</i> , 2009
<i>Austrodiplostomum mordax</i> Szidat & Nani, 1951*	<i>Biomphalaria peregrina</i>	c	Argentina	Ostrowski de Nuñez, 1977
<i>Posthodiplostomum nanum</i> Dubois, 1937	<i>Uncancylus concentricus</i>	d	Argentina	Ostrowski de Nuñez, 1973
<i>Posthodiplostomum</i> sp.	<i>Anisancylus obliquus</i>	e	Argentina	Rittosa <i>et al.</i> , 2013
Strigeidae				
<i>Apharyngostrigea simplex</i> (Johnston, 1904)	<i>Biomphalaria straminea</i>	f	Argentina	Ostrowski de Núñez, 1989
<i>Apharyngostrigea</i> sp.	<i>B. straminea</i> e <i>B. peregrina</i>	g	Brasil	Lutz, 1929
<i>Apatemon graciliformis</i> (Rudolphi, 1819)	<i>Biomphalaria glabrata</i>	*	Guadalupe	Combes & Nassi, 1977
<i>Australapatemon bdello cystis</i> (Lutz, 1921)	<i>Biomphalaria straminea</i>	h	Brasil	Lutz, 1921;1933
	<i>Biomphalaria glabrata</i>		Argentina	Lutz, 1921; 1933
<i>Australapatemon magnacetabulum</i> Dubois, 1988	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	i	Argentina	Davies & Ostrowski de Núñez, 2012
<i>Cotylurus lutzi</i> Basch, 1969	<i>Biomphalaria glabrata</i>	j	Brasil	Basch, 1969
<i>Strigea falconis</i> Szidat, 1929	<i>Drepanotrema anatinum</i>	*	Brasil	Lutz, 1929; Dubois, 1970a

*Figura não disponível

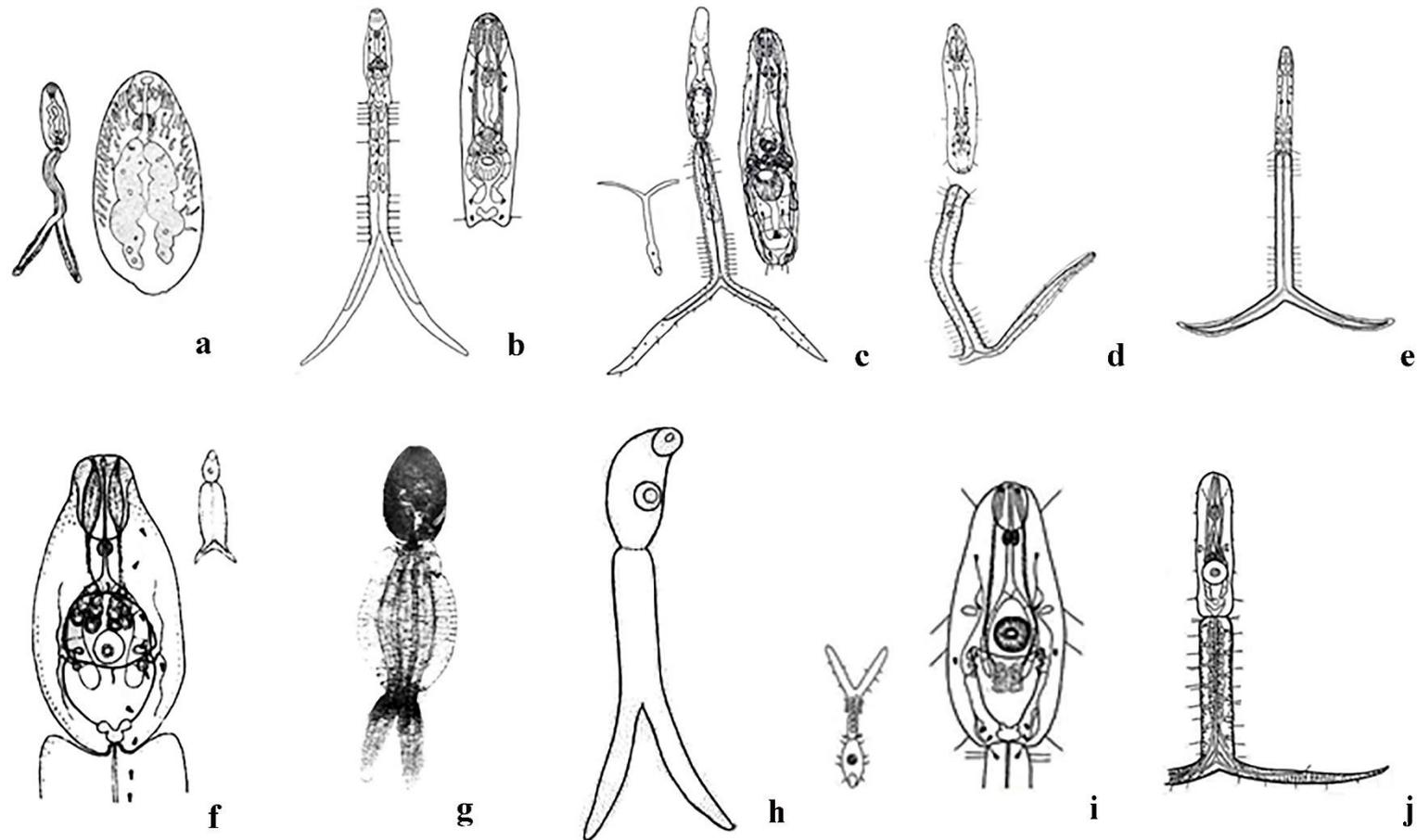


FIGURA 5- Espécies de trematódeos da superfamília Diplostomoidea com ciclos de vida elucidados na América Latina. **a.** *Mesostephanus odhneri*, **b.** *Austrodiplostomum compactum*, **c.** *Austrodiplostomum mordax*, **d.** *Posthodiplostomum nanum*, **e.** *Posthodiplostomum* sp., **f.** *Apharyngostrigea simplex*, **g.** *Apharyngostrigea* sp. **h.** *Australapatemon bdello cystis*, **i.** *Australapatemon magnacetabulum*, **j.** *Cotylurus lutzi*.

TABELA 2- Larvas de trematódeos da superfamília Diplostomoidea encontradas em moluscos na América Latina, mas ainda não associadas aos respectivos parasitos adultos.

Espécie	Molusco	Localidade	Figura	Referência
			n° 6	
<i>Apatemon</i> sp.	<i>Chilina donbeyana</i>	Argentina	*	Flores & Semenas, 2008
<i>Furcocercária</i> sp. (cf. <i>Apatemon</i> (<i>Australapatemon</i>))	<i>Chilina</i> sp.	Argentina	a	Ostrowski de Nuñez & Quaggioto, 1995
<i>Furcocercária</i> sp. (cf. <i>Tylodelphys</i>)	<i>Chilina</i> sp.	Argentina	b	Ostrowski de Nuñez & Quaggioto, 1995
<i>Furcocercaria</i> sp. I	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Argentina	c	Ostrowski de Nuñez, 1972
	<i>Biomphalaria straminea</i>	Argentina		Ostrowski de Nuñez, 1990
	<i>Biomphalaria straminea</i>	Argentina		Ostrowski de Nuñez <i>et al.</i> , 1990
<i>Furcocercaria</i> sp. II	<i>Uncancylus concentricus</i>	Argentina	d	Ostrowski de Nuñez, 1972
<i>Furcocercaria</i> sp. III	<i>Drepanotrema kermatoides</i>	Argentina	e	Ostrowski de Nuñez, 1977
	<i>Biomphalaria occidentalis</i>	Argentina		Ostrowski de Nuñez & Hamann, 1977
	<i>Biomphalaria occidentalis</i>	Argentina		Ostrowski de Nuñez <i>et al.</i> , 1991
	<i>Biomphalaria occidentalis</i>	Argentina		Ostrowski de Nuñez <i>et al.</i> , 1997
	<i>Biomphalaria tenagophila</i> ; <i>Biomphalaria occidentalis</i>	Argentina		Fernandez <i>et al.</i> , 2016
<i>Furcocercaria</i> sp. IV	<i>Gundlachia</i> sp.	Argentina	f	Ostrowski de Nuñez, 1977
<i>Furcocercaria</i> sp. V	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Argentina	g	Ostrowski de Nuñez, 1977
<i>Furcocercaria</i> sp. VI	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Argentina	h	Ostrowski de Nuñez, 1977

TABELA 2- Continuação...

<i>Furcocercaria</i> sp. VII	<i>Uncancylus concentricus</i>	Argentina	i	Ostrowski de Nuñez, 1977
<i>Furcocercaria</i> sp. VIII (aff. <i>Strigea</i> sp., <i>Parastrigea</i>)	<i>Biomphalaria orbignyi</i>	Argentina	j	Ostrowski de Nuñez <i>et al.</i> , 1997
<i>Furcocercaria</i> sp. IX	<i>Biomphalaria orbignyi</i> <i>Biomphalaria peregrina</i>		*	Ostrowski de Nuñez <i>et al.</i> , 1997
<i>Furcocercaria</i> sp. X	<i>Biomphalaria orbignyi</i>	Argentina	k	Ostrowski de Nuñez <i>et al.</i> , 1997
<i>Furcocercaria</i> sp. XIII (aff. <i>Strigea</i> sp.)	<i>Biomphalaria orbignyi</i> <i>Biomphalaria tenagophila</i>	Argentina	l	Ostrowski de Nuñez <i>et al.</i> , 1997
<i>Furcocercaria</i> sp. XIV	<i>Biomphalaria straminea</i>	Argentina	m	Fernandez <i>et al.</i> , 2013
<i>Furcocercaria</i> sp. XV	<i>Biomphalaria straminea</i>	Argentina	n	Fernandez <i>et al.</i> , 2013
<i>Furcocercaria</i> sp. XVII	<i>Biomphalaria straminea</i>	Argentina	o	Fernandez <i>et al.</i> , 2013
<i>Furcocercaria</i> sp. XIX	<i>Biomphalaria straminea</i>	Argentina	p	Fernandez & Hamann, 2017
<i>Furcocercaria</i> sp. XX	<i>Biomphalaria straminea</i>	Argentina	q	Fernandez & Hamann, 2017
n° 7				
<i>Furcocercaria</i> sp. XVII	<i>Biomphalaria straminea</i>	Argentina	a	Fernandez <i>et al.</i> , 2013
<i>Tylodelphys</i> sp.	<i>Chilina donbeyana</i>	Argentina		Flores & Sememnas, 2008
<i>Apharyngostrigea</i> sp.	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Brasil	b	Dias <i>et al.</i> , 2002
<i>Cercaria amplicoecata</i>	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil	c	Ruiz, 1953
<i>Cercaria ancylina</i>	<i>Ancylus</i> sp.	Brasil	*	Lutz, 1933
<i>Cercaria brevicorpus</i>	<i>Lymnaea peregrina</i>	Brasil	*	Lutz, 1933
<i>Cercaria caratinguensis</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Brasil	d	Ruiz, 1953
	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil		Milward de Andrade & Campos, 1969
	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil		Artigas <i>et al.</i> , 1970
	<i>Biomphalaria</i> spp.	Brasil		Souza <i>et al.</i> , 1981
	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil		Espíndola <i>et al.</i> , 1992
	<i>Drepanotrema cimex</i>	Brasil		Espíndola <i>et al.</i> , 1992

TABELA 2- Continuação...

	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil		Coletto <i>et al.</i> , 1993
	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Brasil		Souza <i>et al.</i> , 1998
	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil		Souza <i>et al.</i> , 1998
	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil		Souza <i>et al.</i> , 1998a
	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Brasil		Grault <i>et al.</i> , 1998
	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil		Grault <i>et al.</i> , 1998
	<i>Biomphalaria</i> sp.	Brasil		Carvalho <i>et al.</i> , 2001b
	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil		Moraes <i>et al.</i> , 2009
	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil		Eduardo <i>et al.</i> , 2012
<i>Cercaria conchicola</i>	Unionidae	Brasil	e	Lutz, 1933
<i>Cercaria crassipira</i>	Bivalvia	Brasil	f	Lutz, 1933
<i>Cercaria guaibensis</i> 1	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil	g	Veitenheimer-Mendes, 1981
<i>Cercaria guaibensis</i> 5	<i>Gundlachia concentrica</i>	Brasil	h	Veitenheimer-Mendes <i>et al.</i> , 1995
<i>Cercaria gyrinipeta</i>	<i>Drepanotrema anatinum</i>	Brasil	i	Lutz, 1933
<i>Cercaria mediohyalina</i>	<i>Ayalacostoma tuberculata</i>	Brasil	j	Lutz, 1933
<i>Cercaria molluscipeta</i>	<i>Biomphalaria</i> sp.	Brasil	k	Lutz, 1933
<i>Cercaria phanerochorde</i>	<i>Pomacea</i> sp.	Brasil	*	Lutz, 1933
<i>Cercaria piscipeta</i>	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil	l	Lutz, 1933
<i>Cercaria problemática</i>	<i>Physa marmorata</i>	Brasil	*	Lutz, 1933
<i>Cercaria spirochorde</i>	<i>Drepanotrema</i> sp.	Brasil	*	Lutz, 1933
<i>Cercaria zygochorde</i>	<i>Ayalacostoma tuberculata</i>	Brasil	m	Lutz, 1933
Diplostomidae	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Brasil	n	Dias <i>et al.</i> , 2002

TABELA 2- Continuação...

<i>Furcocercaria</i> (Ocelada/longifurcada)	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil	o	Machado <i>et al.</i> , 1987
			n°8	
<i>Furcocercaria</i> (sem ocelos/longifurcada)	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil	a	Machado <i>et al.</i> , 1987
<i>Furcocercaria</i> 1	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Brasil	b	Veitenheimer-Mendes, 1982
Strigeidae	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Brasil	c	Dias <i>et al.</i> , 2002
<i>Strigea-cercaria</i>	<i>G. radiata</i> ; <i>B. occidentalis</i>	Brasil	d	Mattos <i>et al.</i> , 2013
Strigeidae/Diplostomidae 1	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Brasil	e	Dias <i>et al.</i> , 2002
Strigeidae/Diplostomidae 2	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Brasil	f	Dias <i>et al.</i> , 2002
Strigeidae/Diplostomidae 3	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Brasil	g	Dias <i>et al.</i> , 2002
<i>Apharyngostrigea</i> sp.	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Guadalupe	h	Nassi, 1987
<i>Furcocercaria</i> sp.	<i>Physella cubensis</i>	Guadalupe	*	Barragán-Saenz <i>et al.</i> , 2009
<i>Tylodelphys</i> sp.	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Guadalupe	i	Nassi, 1987
<i>Cercaria caribbea</i> LVIII	<i>Cerithium variabile</i>	Jamaica	j	Cable, 1963
<i>Cercaria caribbea</i> LI	<i>Cerithium literatum</i>	Porto Rico	k	Cable, 1956
<i>Cercaria neotropicalis</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Porto Rico	l	Faust & Hoffman, 1934
<i>Furcocercaria</i> 1	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Uruguai	m	Martorelli <i>et al.</i> , 2013
<i>Furcocercaria</i> 2	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Uruguai	n	Martorelli <i>et al.</i> , 2013
<i>Furcocercaria</i> 3	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Uruguai	o	Martorelli <i>et al.</i> , 2013
<i>Furcocercaria</i> 4	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Uruguai	p	Martorelli <i>et al.</i> , 2013
<i>Furcocercaria</i> 5	<i>Biomphalaria straminea</i>	Uruguai	q	Martorelli <i>et al.</i> , 2013
			n°9	
<i>Cercaria allotropicalis</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Venezuela	a	Nasir & Scorza, 1966
<i>Cercaria cornuaretis</i>	<i>Marisa cornuaretis</i>	Venezuela	b	Nasir <i>et al.</i> , 1969

TABELA 2- Continuação...

<i>Cercaria criollissima</i>	<i>Cerithium literatum</i>	Venezuela	c	Nasir, 1983
<i>Cercaria cumanacoensis</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	d	Nasir, 1964b
<i>Cercaria ghaziaporzanae</i>	<i>Gundlachia</i> sp.	Venezuela	e	Nasir, 1979
<i>Cercaria hinchicauda</i>	<i>Biomphalaria kuhniana</i>	Venezuela	f	Nasir & Díaz, 1973
<i>Cercaria husicauda</i>	<i>Biomphalaria kuhniana</i>	Venezuela	g	Nasir & Díaz, 1973
<i>Cercaria laeovissimus</i>	<i>Pachychilus laeovissimus</i>	Venezuela		Nasir <i>et al.</i> , 1966
<i>Cercaria manzanarensis</i>	<i>Lymnaea cubensis</i>	Venezuela	h	Nasir, 1964
<i>Cercaria monagasica</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	i	Nasir <i>et al.</i> , 1969
<i>Cercaria neorientalis</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	j	Nasir & Guevara, 1968
<i>Cercaria patoica</i>	<i>Biomphalaria kuhniana</i>	Venezuela	k	Nasir & Díaz, 1973

* Figura não disponível.

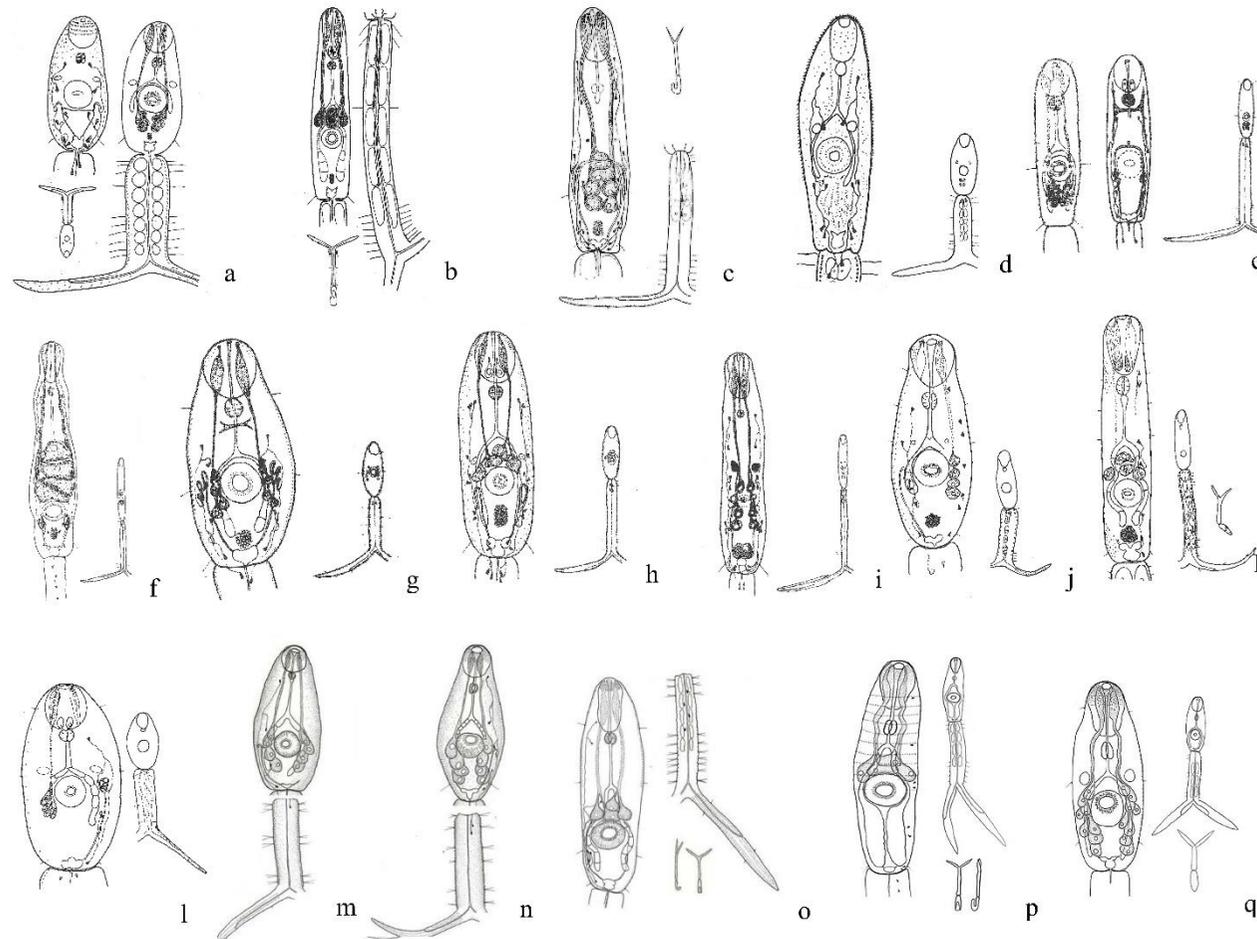


FIGURA 6- Cercárias de Diplostomoidea encontradas em moluscos na América Latina, mas não associadas aos respectivos adultos I. **a.** *Furcocercaria* sp. (cf. *Apatemon* (*Australapatemon*), **b.** *Furcocercaria* sp. (cf. *Tylodelphys*), **c.** *Furcocercaria* sp. I, **d.** *Furcocercaria* sp. II, **e.** *Furcocercaria* sp. III, **f.** *Furcocercaria* sp. IV, **g.** *Furcocercaria* sp. V, **h.** *Furcocercaria* sp. VI, **i.** *Furcocercaria* sp. VII, **j.** *Furcocercaria* sp. VIII, **k.** *Furcocercaria* sp. X, **l.** *Furcocercaria* sp. XIII (aff. *Strigea* sp.), **m.** *Furcocercaria* sp. XIV, **n.** *Furcocercaria* sp. XV, **o.** *Furcocercaria* sp. XVII, **p.** *Furcocercaria* XIX, **q.** *Furcocercaria* XX.

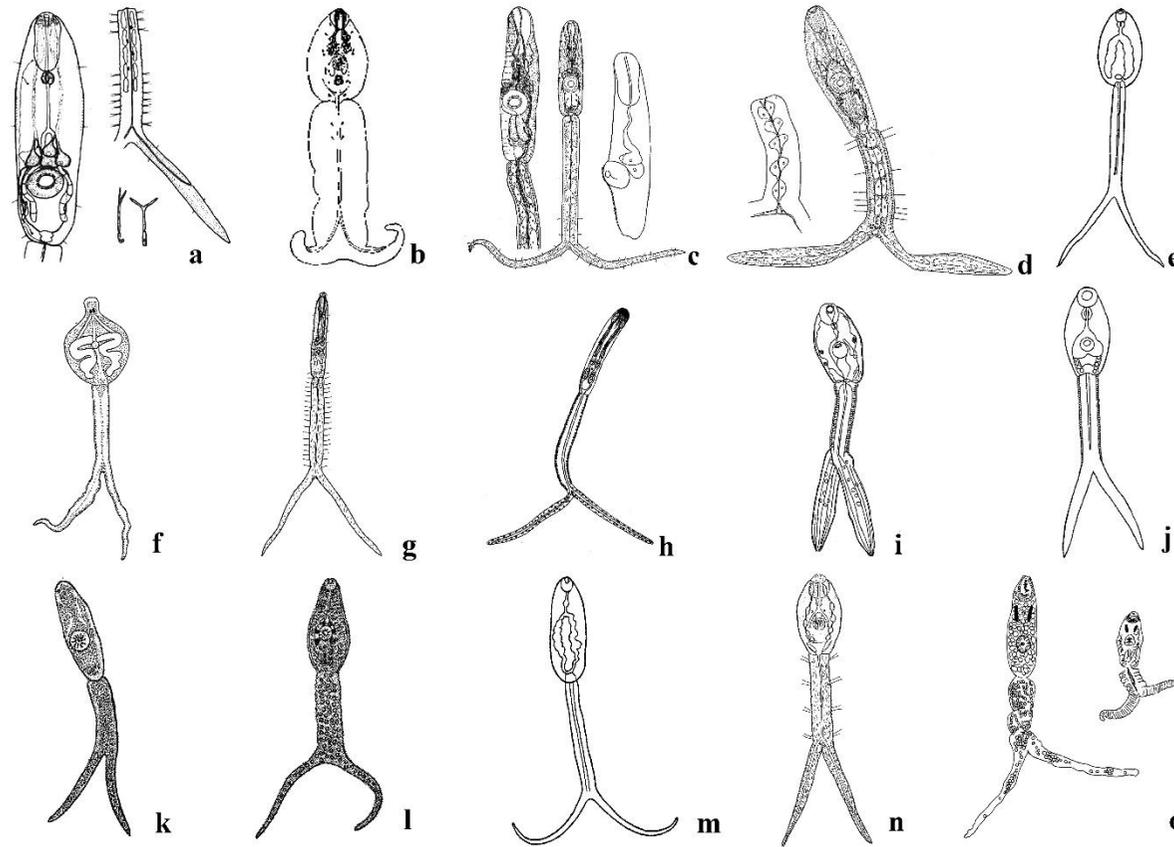


FIGURA 7- Cercárias de Diplostomoidea encontradas em moluscos na América Latina mas ainda não associadas aos respectivos adultos II. **a.** *Furcocercaria* sp. XVII, **b.** *Apharyngostrigea* sp., **c.** *Cercaria amplicoecata*, **d.** *Cercaria caratinguensis*, **e.** *Cercaria conchicola*, **f.** *Cercaria crassipira*, **g.** *Cercaria guaibensis* 1, **h.** *Cercaria guaibensis* 5, **i.** *Cercaria gyripeta*, **j.** *Cercaria mediohyalina*, **k.** *Cercaria molluscipeta*, **l.** *Cercaria piscipeta*, **m.** *Cercaria zygochorde*, **n.** Diplostomidae, **o.** *Furcocercaria* (Ocelada/longifurcada).

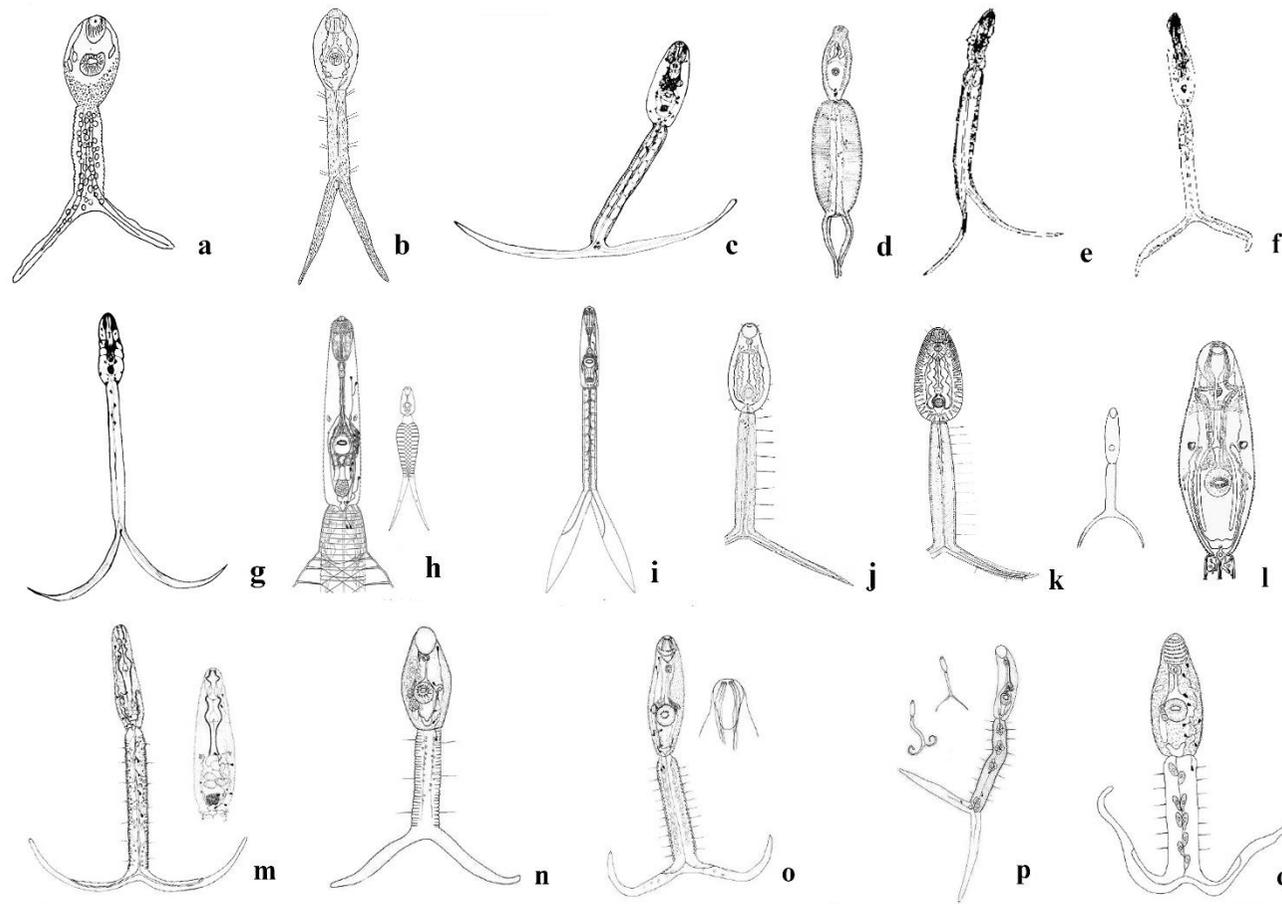


FIGURA 8- Cercárias de Diplostomoidea encontradas em moluscos na América Latina, mas ainda não associadas aos respectivos adultos III. **a.** *Furcocercaria* (sem ocelos/longifurcada), **b.** *Furcocercaria* 1, **c.** Strigeidae, **d.** *Strigea-cercaria*, **e.** Strigeidae/Diplostomidae 1, **f.** Strigeidae/Diplostomidae 2, **g.** Strigeidae/Diplostomidae 3, **h.** *Apharyngostrigea*, **i.** *Tylodelphys* sp., **j.** *Cercaria caribbea* LVIII, **k.** *Cercaria caribbea* LI, **l.** *Cercaria neotropicalis*, **m.** *Furcocercaria* 1, **n.** *Furcocercaria* 2, **o.** *Furcocercaria* 3, **p.** *Furcocercaria* 4, **q.** *Furcocercaria* 5.

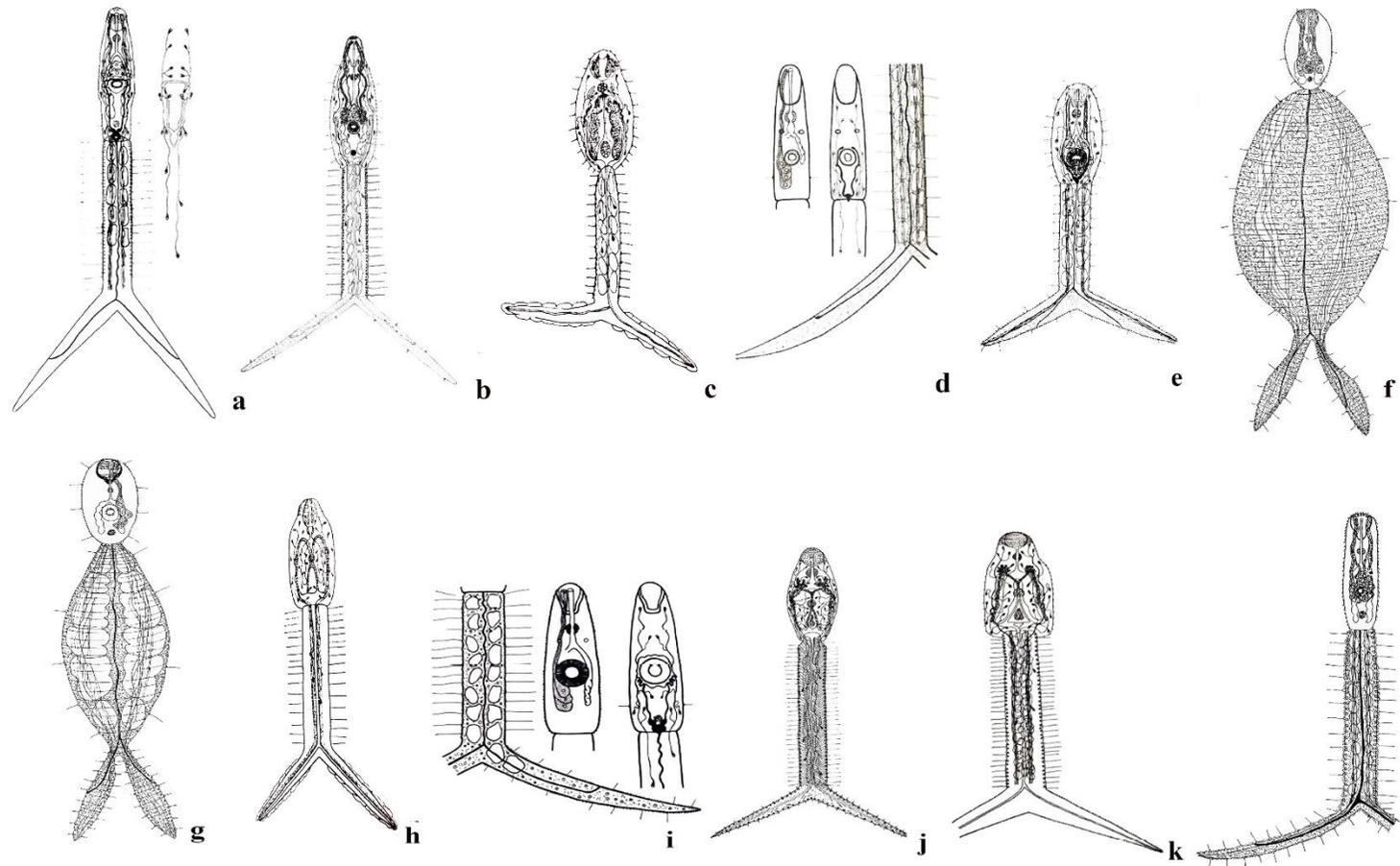


FIGURA 9- Cercárias de Diplostomoidea encontradas em moluscos na América Latina, mas ainda não associadas aos respectivos adultosIV. **a.** *Cercaria allotropicalis*, **b.** *Cercaria cornuaretis*, **c.** *Cercaria criollissima*, **d.** *Cercaria cumanacoensis*, **e.** *Cercaria ghaziaporzanae*, **f.** *Cercaria hinchicauda*, **g.** *Cercaria husicauda*, **h.** *Cercaria laeovissimus*, **i.** *Cercaria manzanarensis*, **j.** *Cercaria monagasica*, **k.** *Cercaria neoorientalis*, **l.** *Cercaria patoica*.

1.2.6- Estudos moleculares em espécies de Diplostomoidea

Em relação ao uso de ferramentas moleculares na avaliação de membros da superfamília Diplostomoidea, a maioria dos estudos existentes foram realizados com espécies pertencentes às famílias Diplostomidae e Strigeidae encontradas na Europa e América do Norte (MOSZCZYNSKA *et al.*, 2009; LOCKE *et al.*, 2010, 2011, 2015; PEREZ DEL OLMO *et al.*, 2014; FALTÝNKOVÁ *et al.*, 2014; AKSENOVÁ *et al.*, 2016; GARCIA-VARELA *et al.*, 2015; 2016; STONAYOV *et al.*, 2017; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017). Além disso, a caracterização molecular de cercárias destes parasitos encontradas em moluscos tem possibilitado a elucidação de novas interações biológicas nestas áreas (LOCKE *et al.*, 2011; FALTÝNKOVÁ *et al.*, 2014; UHRIG *et al.*, 2015; ROSSEER *et al.*, 2016; WONGSAWAD *et al.*, 2016; AKSENOVA *et al.*, 2016).

Na América do Sul, apenas recentemente as primeiras sequências nucleotídicas para 4 espécies de parasitos desta superfamília foram obtidas (Tabela 3). Este número de sequências disponíveis para apenas dois marcadores (COI ou 28S) é irrisório diante da diversidade do grupo relatada no continente. Além disso, amostras de cercárias encontradas em moluscos ainda não foram consideradas. Nesse sentido, a escassez de sequências depositadas nas bases de dados dificultam a utilização da abordagem molecular para a identificação de larvas de representantes da superfamília Diplostomoidea presentes em moluscos da região neotropical.

TABELA 3- Sequências nucleotídicas obtidas a partir de amostras para espécies de Diplostomoidea presentes na América do Sul. Abreviaturas: EE: estágio evolutivo, M: metacercária, A: adulto.

Espécie	EE	Hospedeiro	Localidade	COI	28S	Referência
<i>Austrodiplostomum compactum</i>	M	<i>Satanoperca pappaterra</i>	Brasil	KR271025		Locke <i>et al.</i> , 2015
	M	<i>Satanoperca jurupari</i>	Peru	KR271027		
	M	<i>Cichlasoma</i> sp.	Venezuela			Garcia-Varela <i>et al.</i> , 2015
<i>Alaria</i> sp.	A	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	Argentina	KF572949		Pettrigh <i>et al.</i> , 2013*
<i>Tylodelphys jenynsiae</i>	M	<i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	Argentina	KR271496		Locke <i>et al.</i> , 2015
<i>Braunina cordiformis</i>	A	<i>Delphinus delphis</i>	Argentina		KM258670	

* dados não publicados.

No Brasil, a única sequência molecular disponível (para membros da família Diplostomidae) foi obtida para *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928) por LOCKE *et al.* (2015). Nesse sentido, estudos integrando a taxonomia morfológica clássica com a caracterização molecular podem permitir a elucidação de novas interações biológicas entre moluscos e trematódeos no país. Assim, além de permitir avanços significativos para a taxonomia de helmintos no Brasil (e mesmo para a América do Sul), a identificação dos hospedeiros intermediários podem subsidiar futuras estratégias de controle das espécies potencialmente envolvidas em danos à piscicultura.

2. JUSTIFICATIVA

Os parasitos da superfamília Diplostomoidea representam um grupo de importância médico-veterinária, apresentando ciclos de vida complexos, em sua maioria totalmente desconhecidos. Apesar da diversidade de espécies destes trematódeos relatados em vertebrados no Brasil, a maioria permanece com moluscos transmissores e ciclos biológicos desconhecidos, além de serem escassas as sequências moleculares para este grupo de parasitos no país. Diante do potencial envolvimento destes helmintos em prejuízos à piscicultura, sendo que a perda produzida pela presença dos mesmos em peixes é de aproximadamente o 15% da produção total, a elucidação de novas interações biológicas entre moluscos e larvas de Diplostomoidea pode subsidiar futuras estratégias de controle.

3. OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Realizar a identificação morfológica e molecular de larvas de Diplostomoidea (estridgeocercárias) transmitidas por moluscos dulciaquícolos em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

3.2- Objetivos específicos

- a) Avaliar a infecção natural de moluscos dulciaquícolos por larvas de trematódeos da superfamília Diplostomoidea em coleções aquáticas de Belo Horizonte.
- b) Realizar o estudo morfológico das cercárias obtidas.
- c) Realizar estudos experimentais visando a obtenção e identificação taxonômica dos parasitos adultos.
- d) Obter sequências nucleotídicas (COI, 18S e ITS) das amostras de larvas da superfamília Diplostomoidea encontradas em moluscos.
- e) Realizar análises filogenética a partir das sequências obtidas e outras depositadas no GenBank.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Amostras estudadas

As amostras avaliadas no presente estudo correspondem a larvas do tipo estrigeocercária emergidas de moluscos oriundos de três coleções aquáticas localizadas em Belo Horizonte, Minas Gerais (Lagoa da Pampulha, Lagoa do Nado e Lagoa da Cidade Administrativa) (Figura 10). Foram consideradas amostras previamente coletadas e amostras obtidas a partir de estudos malacológicas realizados durante este estudo.

4.1.1- Amostras previamente coletadas

Este material é composto por 7 amostras de cercárias pertencentes a 3 espécies de Diplostomoidea, as quais foram obtidas durante estudos realizados por PINTO (2013) na represa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais. As espécies identificadas previamente por abordagem morfológica destas amostras são apresentadas na Tabela 4. Visando aumentar o número de sequências para comparação, amostras de outros estágios de desenvolvimento de Diplostomoidea (metacercárias e adultos) obtidos de diferentes hospedeiros e localidades também foram avaliadas (Tabela 4).



FIGURA 10- Vista aérea dos locais de coleta de moluscos para a pesquisa de larvas de Diplostomoidea em Belo Horizonte, Minas Gerais.

TABELA 4- Amostras de trematódeos pertencentes à superfamília Diplostomoidea previamente coletadas e utilizadas para análises morfológica e/ou molecular. Abreviaturas: EE= estágio evolutivo, EMol= Estudo molecular, EMo= estudo morfológico, C= cercária, M= metacercária, A= adulto.

Nome	EE	EMol	EMo	Hospedeiros	Localidades
Amostras de Belo Horizonte					
<i>Austrodiplostomum compactum</i>	C	X	X	<i>Biomphalaria straminea</i>	Lagoa da Pampulha
<i>Austrodiplostomum compactum</i>	C	X	X	<i>Biomphalaria straminea</i>	Lagoa da Pampulha
<i>Austrodiplostomum compactum</i>	C	X	X	<i>Biomphalaria straminea</i>	Lagoa da Pampulha
<i>Hysteromorpha triloba</i>	C	X	X	<i>Biomphalaria straminea</i>	Lagoa da Pampulha
<i>Apharyngostrigea</i> sp.	C	X	-	<i>Biomphalaria straminea</i>	Lagoa da Pampulha
<i>Hysteromorpha triloba</i>	C	X	X	<i>Biomphalaria straminea</i>	Lagoa da Pampulha
<i>Hysteromorpha triloba</i>	C	X	X	<i>Biomphalaria straminea</i>	Lagoa da Pampulha
<i>Apharyngostrigea</i> sp.	M	X	-	<i>Poecilia reticulata</i>	Lagoa da Pampulha
<i>Apharyngostrigea</i> sp. 1	M	X	-	<i>Poecilia reticulata</i>	Lagoa da Pampulha*
<i>Apharyngostrigea</i> sp. 2	M	X	-	<i>Poecilia reticulata</i>	Lagoa da Pampulha*
<i>Austrodiplostomum compactum</i>	M	X	-	<i>Oreochromis niloticus</i>	Lagoa da Pampulha
Amostras de outras localidades					
Strigeidae	C	X	-	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Rio de Janeiro
Strigeidae	M	X	-	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Rio de Janeiro
<i>Hysteromorpha triloba</i>	M	X	X	<i>Squalius cephalus</i>	Itália
<i>Hysteromorpha triloba</i>	A	X	X	<i>Phalacrocorax auritus</i>	Canadá

*Amostras obtidas através de estudos experimentais

4.1.2- Amostras obtidas através de novas coletas malacológicas

Novas amostragens de moluscos e avaliação da infecção por trematódeos foram realizadas em três coleções aquáticas de Belo Horizonte: As coletas malacológicas foram realizadas, entre agosto de 2016 e abril de 2017, no Parque Lagoa do Nado (19°50'17,28''S e 43°57'31,71''O), na Lagoa da Pampulha (19°51'44,77''S e 43°58'29,35''O) e na Lagoa da Cidade Administrativa (19°47'06,20''S e 43°57'11,41''O).

4.1.2.1- Coleta de moluscos

Os caramujos foram coletados em pontos acessíveis com auxílio de uma rede de nylon em forma de D (puçá), a qual foi passada pelas margens das lagoas, percorrendo-se entre 10 a 20 metros. Em cada dia e local se realizou um esforço amostral de cerca de 60 minutos. O material coletado foi transportado para o laboratório, onde foi submetido ao processo de triagem. Os moluscos foram separados da matéria orgânica, vegetação e de outros invertebrados coletados. Em seguida foram lavados com água corrente, avaliados quanto a infecção por larvas de trematódeos e em seguida contatados e identificados segundo diferentes autores (PARAENSE, 1975; SIMONE, 2006).

4.1.2.2- Avaliação da infecção por larvas de trematódeos

Os moluscos obtidos foram colocados individualmente em placas de poliestireno para cultura de células de 24 poços sendo em seguida adicionados 3 mL de água desclorada. As placas contendo moluscos foram expostas à fotoestimulação artificial com uma lâmpada de 60 W por 2 horas. Em seguida, realizou-se exame com o auxílio de microscópio estereoscópico para avaliar a presença de cercárias. As placas contendo os moluscos foram deixados overnight e um novo exame foi realizado na manhã seguinte.

4.2- Estudos experimentais

As novas amostras de estrigeocercárias que foram obtidas durante as coletadas malacológicas foram utilizadas em tentativas de infecções experimentais visando a obtenção de outros estágios evolutivos (metacercárias e parasitos adultos). Os ensaios experimentais envolvendo a infecção de hospedeiros vertebrados possui aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 20/2016).

4.2.1- Obtenção experimental de metacercárias

Cercárias do tipo estrigeocercária emergidas de moluscos foram utilizadas para a infecção de peixes ou moluscos criados em laboratório. A escolha do hospedeiro foi realizada de acordo como o possível padrão de ciclo biológico inferido a partir da morfologia da larva. Para isso, foram utilizados grupos de 5-20 exemplares adultos de *Poecilia reticulata* Peters, 1859 (Pisces: Poeciliidae) por serem os hospedeiros utilizados por diferentes autores na literatura, criados e mantidos em laboratório, de ambos os sexos, medindo de 2 a 4 cm de comprimento total. Realizou-se a infecção em massa, que consistiu em deixar os peixes em contato com os moluscos infetados por 24 horas em um aquário com 1 L de água isenta de cloro. Os peixes foram alimentados diariamente. A eutanásia dos peixes foi feita 7-70 DAI (dependendo da espécie de parasito).

Nos experimentos avaliando a participação de outra espécie de molusco como hospedeiro intermediário, exemplares de *B. glabrata*, medindo de 5-7 cm, criados em laboratório foram transferidos para placas de poliestireno contendo amostras das estrigeocercárias em análise.

Visando avaliar o sucesso da infecção experimental, os peixes foram eutanasiados por imersão em solução de hidrocloreto de benzocaína (250 mg/L) e necropsiados. Os órgãos da cavidade abdominal (estômago, intestino e fígado), brânquias e as aletas foram transferidos para lâminas de vidro contendo solução fisiológica (NaCl 0,85%) e examinadas em microscópio estereoscópico para a pesquisa das metacercárias. No caso dos moluscos, estes foram prensados entre lâminas de vidro e examinados em estereomicroscópio.

4.2.2- Infecção experimental de hospedeiros definitivos

Para as espécies em que foi possível se obter metacercárias experimentalmente, realizou-se a infecção de exemplares de *Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758 (Galliformes: Phasianidae) e *Mus musculus* Linnaeus, 1758 (Rodentia: Muridae). Para isso, as metacercárias foram contadas (cerca de 30) e inoculadas por via oral em dois exemplares de cada espécie. Visando aumentar a suscetibilidade aos parasitos, no caso dos roedores, realizou-se a administração diária de fosfato dissódico de dexametasona (Decadron®, Ache, Brasil) por via subcutânea na dosagem de 25 mg/kg.

Os indivíduos infectados experimentalmente foram eutanasiados (após 2-7 dias de infecção) com uso de uma superdosagem de pentobarbital sódico (). A cavidade abdominal foi exposta e as vísceras foram removidas, sendo transferidas a uma placa de Petri contendo solução fisiológica (NaCl a 0,85%). Os intestinos foram abertos longitudinalmente com auxílio de tesoura, dividido em três partes (anterior, médio e posterior), colocados em placas de Petri e o conteúdo foi examinado em estereomicroscópio para a pesquisa de parasitos.

4.3- Estudo morfológico dos estágios evolutivos

Amostras das cercárias obtidas foram inicialmente coletadas com uma micropipeta, transferidas para lâminas de vidro, coradas com corantes vitais (solução aquosa de vermelho neutro ou sulfato azul de Nilo 0,05%) e utilizadas para a confecção de montagens não permanentes (a fresco), que foram examinadas em microscópio de luz. Outra alíquota da solução contendo cercárias foi morta em água a 70°C e fixada em formalina 4%. Parte destas larvas foram coradas por carmim aceto-alúmen, desidratadas numa bateria de álcoois, clarificadas em creosoto de Faia e montadas em preparações permanentes com bálsamo de Canadá. As metacercárias e parasitos adultos recuperados das infecções experimentais foram também mortos em água quente (70°C), fixados em formalina 4% e corados, da mesma maneira descrita para as cercárias. A análise morfométrica dos estágios evolutivos foi realizada com auxílio de ocular micrometrada em microscópio de luz. As mensurações das cercárias foram obtidas a partir de larvas mortas pelo calor e fixadas em formol. As medidas das metacercárias e adultos foram realizadas através da análise de espécimes corados e montados. As medidas foram tabuladas e analisadas em software Microsoft® Excel 2010. As fotografias foram

obtidas com câmara digital Leica ICC50 HD, acoplada ao microscópio Leica ICC50HD. As medidas estão apresentadas em micrometros.

A identificação dos parasitos obtidos, até a menor categoria taxonômica possível, foi realizada com o auxílio de chaves taxonômicas de GIBSON *et al.* (2002) e descrições de espécies e ciclos biológicos realizadas por diferentes autores.

4.4- Estudo molecular

4.4.1- Fixação das cercárias

As amostras de cercárias pertencentes às famílias avaliadas no presente estudo, tanto as previamente coletadas quanto as novas amostras obtidas, foram fixadas em etanol 95% e armazenadas a -20°C até a realização das análises moleculares.

4.4.2- Extração e quantificação de DNA

As cercárias previamente fixadas foram submetidas a extração de DNA através do uso de kits comerciais. Para amostras com maior quantidade de espécimes (alíquota com no mínimo 50 cercárias) foi utilizado o kit *Wizard[®] Genomic DNA Purification*. Para amostras com menor quantidade de larvas foi utilizado o kit *QIAamp[®] DNA micro kit*, sendo utilizadas de 3 a 10 cercárias. As etapas envolvidas na extração foram realizadas seguindo-se as instruções dos fabricantes. O DNA extraído foi dosado através da avaliação da absorvância em 260nm em espectrofotômetro de microvolume NanoDrop[®] ND-1000. Para determinação da pureza do DNA extraído, determinou-se a relação da absorvância obtidas nos comprimentos de onda 260nm e 280 nm.

4.4.3- Amplificação do DNA

Três marcadores moleculares foram utilizados para o estudo das amostras avaliadas: (1) região parcial do gene 18S rRNA, (2) o gene da região espaçadora transcrita interna (ITS), (3) porção parcial do gene mitocondrial citocromo *c* oxidase subunidade I (COI) (região *barcoding*). Estes marcadores são amplamente utilizados em estudos de identificação molecular e filogenéticos de trematódeos (BLASCO-COSTA *et al.*, 2016). Um esquema geral representativo do fluxo de análise das amostras avaliadas no presente estudo, incluindo a seleção de primers, enzimas, processo de purificação e técnicas de análise (PCR direta ou clonagem) é apresentado na Figura 11.

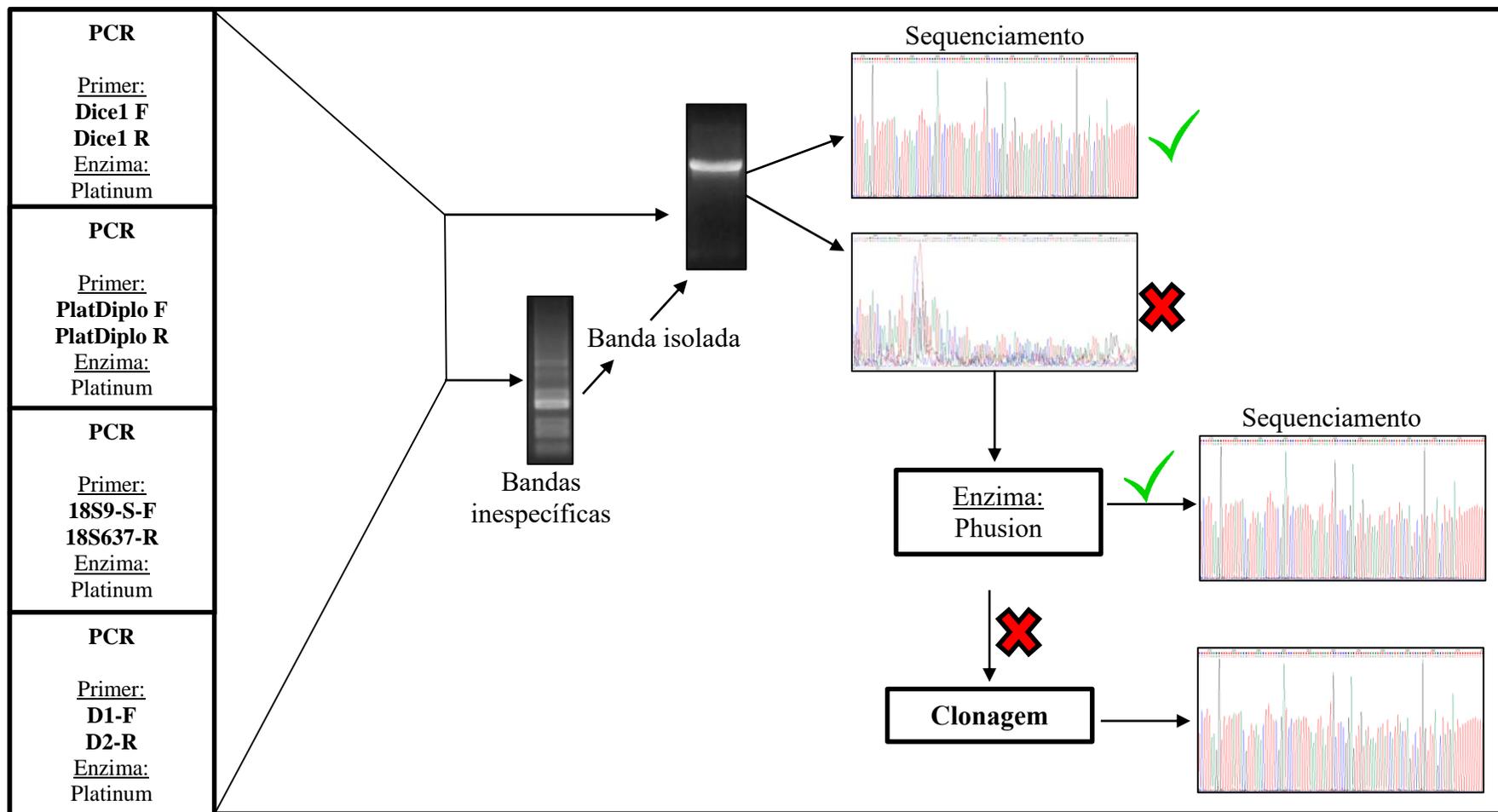


FIGURA 11- Esquema representativo do fluxo de análise molecular de amostras de Diplostomoidea avaliadas no presente estudo.

Para a região 18S foram utilizados os primers 18S9F e 18S300R segundo MOSZCZYNSKA *et al.* (2009). Para a amplificação da região completa de ITS foram utilizados os *primers* D1 (F) e D2 (R) descritos por GALAZZO *et al.* (2002). Por fim, para a amplificação de um fragmento do gene mitocondrial COI foram utilizados os *primers* Dice1-F e Dice11- R descritos por VAN STEENKISTE *et al.* (2015) e os específicos para a família Diplostomidae, Plat-diploCOX1F e Plat-diploCOX1R, desenhados por MOSZCZYNSKA *et al.* (2009).

O protocolo utilizado para a realização do estudo molecular foi o descrito por MOSZCZYNSKA *et al.* (2009) com pequenas modificações. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µl, que inclui tampão (20 Mm Tris-HCL pH 8,4, 50 mM HCL), 2.5 mM MgCl₂, 1,25 pmol de cada iniciador, 50 µM de dNTP, 0,6 U da enzima *Platinum™ Taq DNA Polymerase* e 5-50 ng do DNA molde. As condições de PCR utilizadas para cada marcador molecular utilizado são apresentadas na Tabela 5. Para a visualização dos produtos da amplificação, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% corado com *GelRed®* (Biotium, EUA). O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado pela comparação com padrão de pesos moleculares.

4.4.4- Purificação dos produtos de PCR

4.4.4.1- Purificação por PEG

Após a visualização de bandas únicas no gel, realizou-se a purificação dos produtos da PCR com polietileno glicol (PEG) (20% PEG 8.000 em solução de NaCl 2,5M) (Promega, EUA). Para garantir a recuperação de uma quantidade suficiente do fragmento de DNA amplificado, realizou-se a PCR de cada amostra em duplicata, sendo utilizados 5 µL do produto da reação para a purificação. O conteúdo restante (45µl) foi transferido a um tubo de microcentrífuga de 0,5 mL, adicionando-se em seguida PEG na mesma quantidade e posteriormente, homogeneizado em vórtex por 1 minuto. O tubo foi incubado em banho seco a 37°C por 15 minutos e em seguida este foi centrifugado por 15 min a 14.000 rpm, sendo o sobrenadante descartado. Posteriormente, 125 µL de etanol 80% refrigerado foi adicionado, o tubo centrifugado por 5 min a 14.000 rpm e o sobrenadante descartado. O passo mencionado anteriormente foi repetido uma vez mais. Ao final deste processo, o tubo foi mantido à temperatura ambiente até a evaporação de

todo o etanol e o DNA foi ressuspenso em 20 μL de água ultrapura e dosado em NanoDrop® ND-1000.

4.4.4.2- Purificação por GFX

Quando da presença de bandas inespecíficas, a banda de interesse foi cortada do gel e a purificação realizada através do kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Inglaterra). Para garantir a recuperação de uma quantidade suficiente do fragmento de DNA amplificado, realizou-se a PCR de cada amostra em duplicata, sendo nestes casos utilizados 5 μL do produto da reação para a purificação. A banda cortada do gel foi transferida para um microtubo de 2 mL, sendo pesada e em seguida foram adicionados 10 μL de tampão tipo 3 para cada 10 mg do gel. Realizou-se a mistura por inversão e incubação em banho seco por 15 minutos a 60°C. A solução obtida foi transferida (até 600 μL da banda + o tampão tipo 3) para uma coluna *GFX MicroSpin* acoplada a em tubo coletor, que foi incubado a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado a 16 000 $\times g$ por 30 segundos. Após este processo o tubo coletor foi substituído e em seguida 500 μL de tampão tipo 1 foi adicionado a coluna, e uma nova centrifugação a 16 000 $\times g$ por 30 segundos realizada. Depois de se descartar o tubo coletor, a coluna foi colocada em um tubo de 1,5 mL, sendo adicionados 20 μL de água ultrapura no centro da membrana da coluna, a qual foi incubada por 1 minuto a temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 16.000 $\times g$ por 1 minuto.

4.4.5- Clonagem

Para as amostras em que não foi possível a obtenção de resultados satisfatórios através de sequenciamento direto de produtos de PCR, realizou-se a técnica de clonagem descrita a seguir.

4.4.5.1- Ligação, transformação e PCR de colônia

Os produtos de PCR das amostras de cercárias foram clonados com o *kit pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega, EUA) com modificações do protocolo do fabricante. Para a termotransformação, um volume de 2 μL do produto de ligação foi

transformado em 30µl de células quimiocompetentes de *E. coli* da linhagem *XLI-blue* (Phoneutria, Brasil). As células bacterianas potencialmente transformadas foram incubadas por 1h a 37°C em 500µl de meio líquido Circlegrow® (MP Biomedicals, EUA) pH 7, com posterior plaqueamento das mesmas em meio sólido seletivo *Circlegrow*® (MP Biomedicals, EUA), contendo ampicilina (100µg/ml). As placas foram incubadas a 37°C por cerca de 16h.

A presença dos insertos de interesse nos plasmídeos recombinantes foi confirmada por meio de uma reação de PCR de colônia, com os primers: M13 forward e reverso (Tabela 5). Os produtos da amplificação foram visualizados após eletroforese de gel de agarose 1,0% (m/v), com tampão TAE 0,5x e corado com *GelRed*® (Biotium, EUA). Após a confirmação da presença dos insertos recombinantes, foram inoculados fragmentos das colônias em tubos de 15 mL (do tipo Falcon) contendo 3ml de meio de cultura líquido Circlegrow® (MP Biomedicals) com 3µl de ampicilina (100µg/ml) e incubados aproximadamente 22h, a 37°C, sob agitação constante (5.000xg).

4.4.5.2- Recuperação do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi recuperado através do kit *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, EUA). O DNA plasmidial resultante foi eluído em 40µl de água ultrapura. O tubo foi centrifugado a 14.000xg por 1min a temperatura ambiente e estocado a -20°C.

4.4.6- Sequenciamento de DNA

Os *amplicons* obtidos foram sequenciados com os mesmos *primers* mencionados para a amplificação, no caso dos *amplicons* obtidos com os primers Dice 1-F e Dice 11-R, foram utilizados para o sequenciamento os *primers* T3(F) e T7(R) (Tabela 5), de acordo com VAN STEENKISTE *et al.* (2015). Os produtos da PCR purificados foram preparados para o sequenciamento segundo as recomendações da empresa Myleus Biotechnology (Belo Horizonte, Brasil) (<https://www.myleus.com/>), sendo sequenciadas por eletroforese capilar com o sequenciador automático ABI3730, utilizando-se polímero BigDye v3.1 e POP7.

TABELA 5- Primers utilizados para a amplificação de fragmentos dos genes COI, 18S e a região de ITS de amostras de Diplostomoidea encontradas em moluscos dulçaquícolas em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Primer	Sequência 5'-3'	Tamanho do fragmento (pb)	Uso	Gene	Condições da PCR	Referência
Dice 1-F	ATTAACCCTCACTAAATTWCNTRRGATCATAAG	600	PCR	COI	94°C por 2min; 3 ciclos de 94°C por 40s, 51°C por 40s, 72°C por 1min; 5 ciclos de touchdown: de: 94°C por 40s, 50 °C a 46°C por 40s (com uma caída de 1°C por ciclo), 72°C por 1min; 35 ciclos de 94°C por 40s, 45°C por 40s, 72°C por 1min	Van Steenkiste <i>et al.</i> , 2015
Dice 11-R	TAATACGACTCACTATAGCWGWACHAAATTTTHCGATC	600	PCR	COI		
T3	ATTACCCTCACTAAA	600	Sequenciamento	COI		Van Steenkiste <i>et al.</i> , 2015
T7	TAATACGACTCACTATA	600	Sequenciamento	COI		
Plat-DiploCOX1F	CGTTTRAATTATACGGATC	500	PCR/seq	COI	94 °C por 2min; 35 ciclos: 94 °C por 30s,	Moszczynska <i>et al.</i> , 2009
Plat-DiploCOX1R	AGCATAGTAATMGCAGCAGC	500	PCR/seq	COI	50 °C por 30s, 72 °C por 60s	
D1-F	AGGAATTCCTGGTAAGTGCAAG	1100	PCR/seq	ITS	94 °C por 2min; 35 ciclos: 94 °C por 30s,	Galazzo <i>et al.</i> , 2002
D2-R	CGTTACTGAGGGAATCCTGG	1100	PCR/seq	ITS	50 °C por 30s, 72 °C por 10 min	
18S9-S	GATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTG	500	PCR/seq	18S	94 °C por 2min; 35 ciclos: 94 °C por 30s,	Moszczynska <i>et al.</i> , 2009
18S637-R	TACGCTWYTGGAGCTGGAGTTACCG	500	PCR/seq	18S	50 °C por 30s, 72 °C por 10 min	
M13-F	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC	250	PCR/seq	PL	95°C por 5min, 30 ciclos a 95°C por 1min, 52°C por	Boutin-Ganache <i>et al.</i> , 2001
M13-R	TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C	250	PCR/seq		1min, 72°C por 1min e 72°C por 8min.	

4.4.7- Análises das sequências

As sequências obtidas para cada espécie foram montadas e editadas com auxílio do programa ChromasPro versão 2.0.1 (Technelysium Pty Ltd, Austrália), para a obtenção de uma única sequência consenso. Para a pesquisa de similaridade, foram utilizados os programas Basic Alignment Search Tools (BLAST) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (National Library of Medicine, EUA) e do Barcode of Life Data System (BOLDSYSTEMS) do *Centre for Biodiversity Genomics*, Canada (<http://www.boldsystems.org/>). Em seguida, as sequências obtidas foram alinhadas com sequências depositadas no GenBank, com auxílio do programa MEGA 7.0 (KUMAR *et al.*, 2016). Foram consideradas as sequências cogenéricas e as pertencentes ao gênero mais próximo. Os modelos evolutivos utilizados para a construção das árvores filogenéticas foram determinados por Bayesian information criterion (BIC) no programa MEGA 7.0, sendo os resultados obtidos apresentados na Tabela 6. As árvores filogenéticas foram criadas a partir do algoritmo baseado no método filogenético de Máxima Verossimilhança (MV) (FELSENSTEIN, 1981) e Análise Bayesiana (IB). A confiabilidade das análises para Máxima Verossimilhança foi medida pela utilização do teste *bootstrap* com 1000 repetições para avaliar a robustez dos ramos das árvores geradas. As análises de IB foram realizadas com o programa Mr.Bayes v.3.2.6 usando Markov chain Monte Carlo (MCMC) para 1.000.000 de gerações e amostragem a cada 100 gerações. O período de "burnin" foi estabelecido para os primeiros 25% das árvores amostradas. O suporte dos nós foi fornecido pela probabilidade posterior. Para a visualização da árvore foi utilizado o programa FigTree v.1.4.2

TABELA 6- Modelos de substituição de nucleotídeos utilizados para a construção das árvores filogenéticas.

	Diplostomidae	Strigeidae
18S	Kimura 2-Parameter (K2+G+I)	Kimura 2-Parameter (K2+G)
ITS	Kimura 2-Parameter (K2+G)	General Time Reversible (GTR+R)
COI	Tamura Nei (TN93+G+I)	Tamura Nei (TN93+G)

5. RESULTADOS

5.1- Coletas de moluscos e infecção por larvas de trematódeos

Um total de 1.340 exemplares de moluscos pertencentes a 9 espécies, sendo, 35 (2,61%) encontrados infectados por larvas de trematódeos. Destes, 6 (0,45%) estavam positivos para larvas do tipo estrigeocercária e 29 (2,16%) para outros tipos cercarianos (cercárias de Spirorchiidae e Echinostomatidae). Para o presente estudo foram consideradas apenas as estrigeocercárias por ser o tipo cercariano produzido pelos representantes da superfamília Diplostomoidea. As informações relacionadas ao número de moluscos coletados e infetados por larvas de trematódeos em cada uma das áreas e dias de coletas são apresentadas na Tabela 7.

Das 9 espécies de moluscos coletados, duas foram encontradas infectadas por estrigeocercárias: *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) e *Gundlachia ticaga* (Marcus & Marcus, 1962). A primeira espécie foi encontrada infectada na Lagoa da Cidade Administrativa, enquanto a segunda espécie na Lagoa do Nado.

TABELA 7- Exemplares de moluscos coletados e infectados por cercárias durante coletas malacológicas realizadas em três coleções aquáticas de Belo Horizonte, MG, entre os meses de maio de 2016 e maio de 2017. Abreviaturas: EST: Estrigeocercaria; OC: Outras cercárias.

Coleta	Data	Localidade	Espécie	Coletados	Infectados			
					EST	%	OC	%
1	19/05/2016	Cidade Administrativa	<i>Biomphalaria straminea</i>	21	3	14,29	6	28,57
2	08/09/2016	Lagoa da Pampulha	<i>Biomphalaria straminea</i>	108			7	6,48
3	25/10/2016	Lagoa da Pampulha	<i>Biomphalaria straminea</i>	24			1	4,17
			<i>Pseudosuccinea columella</i>	2				
4	22/11/2016	Lagoa do Nado	<i>Biomphalaria straminea</i>	22				
			<i>Physa marmorata</i>	7				
			<i>Drepanotrema</i> sp.	2				
5	14/03/2017	Lagoa do Nado	<i>Gundlachia ticaga</i>	10				
			<i>Biomphalaria straminea</i>	8				
			<i>Physa marmorata</i>	14			1	7,14
			<i>Pseudosuccinea columella</i>	5				
			<i>Drepanotrema</i> sp.	12				
			<i>Potamolithus</i> sp.	9				
6	22/03/2017	Lagoa do Nado	<i>Gundlachia ticaga</i>	46	1	2,17		
			<i>Biomphalaria straminea</i>	18			1	5,56
			<i>Physa marmorata</i>	28				
			<i>Potamolithus</i> sp.	22				
			<i>Melanoides tuberculata</i>	9			1	11,11
			<i>Pseudosuccinea columella</i>	2				
7	05/04/2017	Lagoa da Pampulha	<i>Biomphalaria straminea</i>	61			6	9,84
			<i>Melanoides tuberculata</i>	222				
			<i>Physa acuta</i>	5				
			<i>Pomacea</i> sp.	147				
8	11/05/2017	Lagoa do Nado	<i>Biomphalaria straminea</i>	9				
			<i>Gundlachia ticaga</i>	493	2	0,41	6	1,22
			<i>Physa marmorata</i>	33				
			<i>Pseudosuccinea columella</i>	1				
TOTAL				1.340	6	0,45	29	2,16

5.2- Espécies de Diplostomoidea identificadas

Os estudos morfológicos, experimentais e/ou moleculares realizados a partir de sete amostras de Diplostomoidea previamente obtidas em moluscos da Represa da Pampulha e de outras 4 amostras encontradas durante as novas coletas malacológicas realizadas na Lagoa do Nado e na Lagoa da Cidade Administrativa, revelaram a presença de 6 espécies pertencentes a 6 gêneros e duas famílias destes parasitos.

5.2.1- Família Diplostomidae

5.2.1.1- Aspectos gerais

Três espécies de representantes da família Diplostomidae foram identificadas no presente estudo. Das 7 amostras previamente coletadas na represa da Pampulha, 6 continham representantes de duas espécies desta família. Além disso, 4 novas amostras, incluindo três espécies que não haviam sido previamente coletadas na Represa da Pampulha, foram obtidas em *G. ticaga* (1 espécie) coletada na Lagoa do Nado e em *B. straminea* (2 espécies) coletadas na Lagoa da Cidade Administrativa. As cercárias obtidas durante as novas coletas malacológicas foram utilizadas para a realização de estudos experimentais que possibilitaram a obtenção de estágios evolutivos os quais auxiliaram na identificação de outras duas espécies destes parasitos.

5.2.1.2- Dados moleculares: resultados gerais

Sequências nucleotídicas para os três marcadores (18S, ITS e COI) avaliados no presente estudo foram obtidas para todas as amostras de cercárias de Diplostomidae avaliadas. Estas sequências foram comparadas com outras depositadas no GenBank. As informações sobre o número de acesso, hospedeiros, estágios evolutivos e localidades dos parasitos utilizados para a obtenção destas outras sequências utilizadas para as análises moleculares são apresentadas na Tabela 8.

A amplificação e sequenciamento da região parcial do gene 18S possibilitou a obtenção de bandas de aproximadamente 600 pb. Sequências de boa qualidade foram obtidas em ambas as direções para todas as amostras avaliadas já na primeira tentativa de sequenciamento. Fragmentos de 579 pb foram obtidos após edição das sequências

obtidas. É importante salientar que algumas amostras de cercárias amplificadas com os iniciadores direcionados para 18S, não amplificaram com o uso de outros iniciadores utilizados em nosso estudo. As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas entre si e com outras 14 sequências depositadas no GenBank (Tabela 8). O alinhamento final destas sequências, após edição das extremidades, resultou na análise de fragmentos com 412 pb. As árvores filogenéticas obtidas (Figura 13) revelaram que as três espécies de Diplostomidae avaliadas agruparam-se com representantes dos gêneros identificados por abordagem morfológica e molecular. Destes, apenas uma espécie (*A. compactum*) apresentou sequências idênticas às depositadas no GenBank.

Em relação às análises utilizando sequências da região ITS, foram obtidas sequências de boa qualidade foram obtidas na primeira tentativa de sequenciamento para 9 amostras (64%) das 14 avaliadas. Em outras 4 amostras, verificou-se a presença de bandas inespecíficas no gel. Embora tentativas de isolamento e purificação das bandas de interesse tenham sido realizadas, o baixo rendimento obtido impossibilitou a realização de sequenciamento. Para uma outra amostra, não foi verificada a amplificação, como pode ser constatado pela ausência de bandas após eletroforese dos produtos de PCR. As amplificações por PCR desta região resultaram em bandas de aproximadamente 1100 pb. As sequências obtidas, em ambas direções, para as nove amostras com sequenciamento de qualidade, apresentaram, após edição, fragmentos entre 984 pb e 1273 pb. As nove sequências obtidas foram comparadas entre si e com outras 21 sequências disponíveis no GenBank (Tabela 8). Após edição das extremidades das sequências alinhadas, foram considerados para as análises fragmentos de 1057 pb. A topologia das árvores obtidas por IB e ML (Figura 14) foram semelhantes, sendo verificado que as três espécies identificadas agruparam em três diferentes clados (com elevado suporte) juntamente com representantes dos mesmos gêneros com sequências disponíveis no GenBank. Das três espécies encontradas, duas (*A. compactum* e *Hysteromorpha* sp.) apresentaram 100% de identidade com amostras depositadas no GenBank.

A relativa facilidade na obtenção de sequências nucleotídicas de qualidade adequada verificada com o uso de marcadores nucleares (18S e ITS) para a análise das amostras avaliadas no presente estudo, não foi observada com a utilização do marcador mitocondrial COI. Embora a utilização dos primers Dice1-F e Dice 1-1R tenha resultado em bandas do tamanho esperado (600 pb) em todas as 14 amostras, sequenciamentos com qualidade adequada foram obtidas em apenas seis amostras

(43%). A análise dos eletroferogramas da maioria destas amostras que não resultaram em dados de qualidade revelou que o principal fator relacionado ao insucesso no sequenciamento é a presença de uma cadeia de 13 nucleotídeos de timina denominada (Poli-T) nas sequências no sentido “Forward” (próximo ao nucleotídeo 155) e de adenina (Poli-A) nas sequências no sentido “Reverse” (Figura 12). A presença destas cadeias resulta em um fenômeno denominado *polymerase slippage*, já relatado para algumas amostras de Diplostomidae (MOSZCZYNSKA *et al.*, 2009; VAN-STEENKISTE *et al.*, 2015). Em algumas amostras, sequências uni-direcionais de excelente qualidade puderam ser obtidas a partir da análise das sequências no sentido “Reverse”. Neste caso, fragmentos de 421 pb localizados antes da cadeia poli-A foram considerados.

Diante da impossibilidade de obtenção de sequências de qualidade com os primers Dice1-F e Dice 11R, avaliou-se outro par de primers (denominados Plat-Diplo) para a mesma região do gene COI e específicos para a família Diplostomidae (MOSZCZYNSKA *et al.*, 2009). De 14 amostras avaliadas com estes primers, foi possível obter sequências de qualidade para 6 amostras (43%). Ainda assim, não foi possível a obtenção de sequências de boa qualidade para algumas amostras, sendo verificado o mesmo problema relacionado à presença de cadeias de polinucleotídeos. Entre as estratégias discutidas na literatura para solucionar este problema, encontra-se a utilização de enzimas de alta fidelidade. Assim, avaliamos a performance do sequenciamento de produtos de PCR utilizando a enzima Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, como recomendado por VANSTEENKISTE *et al.* (2015), sendo os resultados obtidos também insatisfatórios. Por fim, foi realizada a técnica de clonagem, com a qual se obteve sucesso nos resultados, mesmo com a presença das cadeias polinucleotídicas (Figura 12). Com o uso das diferentes abordagens especificadas acima, foi possível a obtenção de 7 sequências COI para as 3 espécies de Diplostomidae avaliadas. Após edição, fragmentos entre 390 pb e 582 pb foram considerados nas análises. As sequências das espécies cogenéricas e os gêneros mais próximos verificados para as espécies avaliadas no presente estudo são também apresentadas na Tabela 8. A região considerada para as análises após alinhamento apresentou 384 pb. A árvore filogenética (figura 15) obtida agrupou as espécies encontradas com outras cogenéricas com um elevado suporte. Apenas uma espécie (*A. compactum*) apresentou diferenças moleculares compatíveis para uma identificação específica em relação a outras sequências depositadas no GenBank e BoldSystem (0-0,9%).

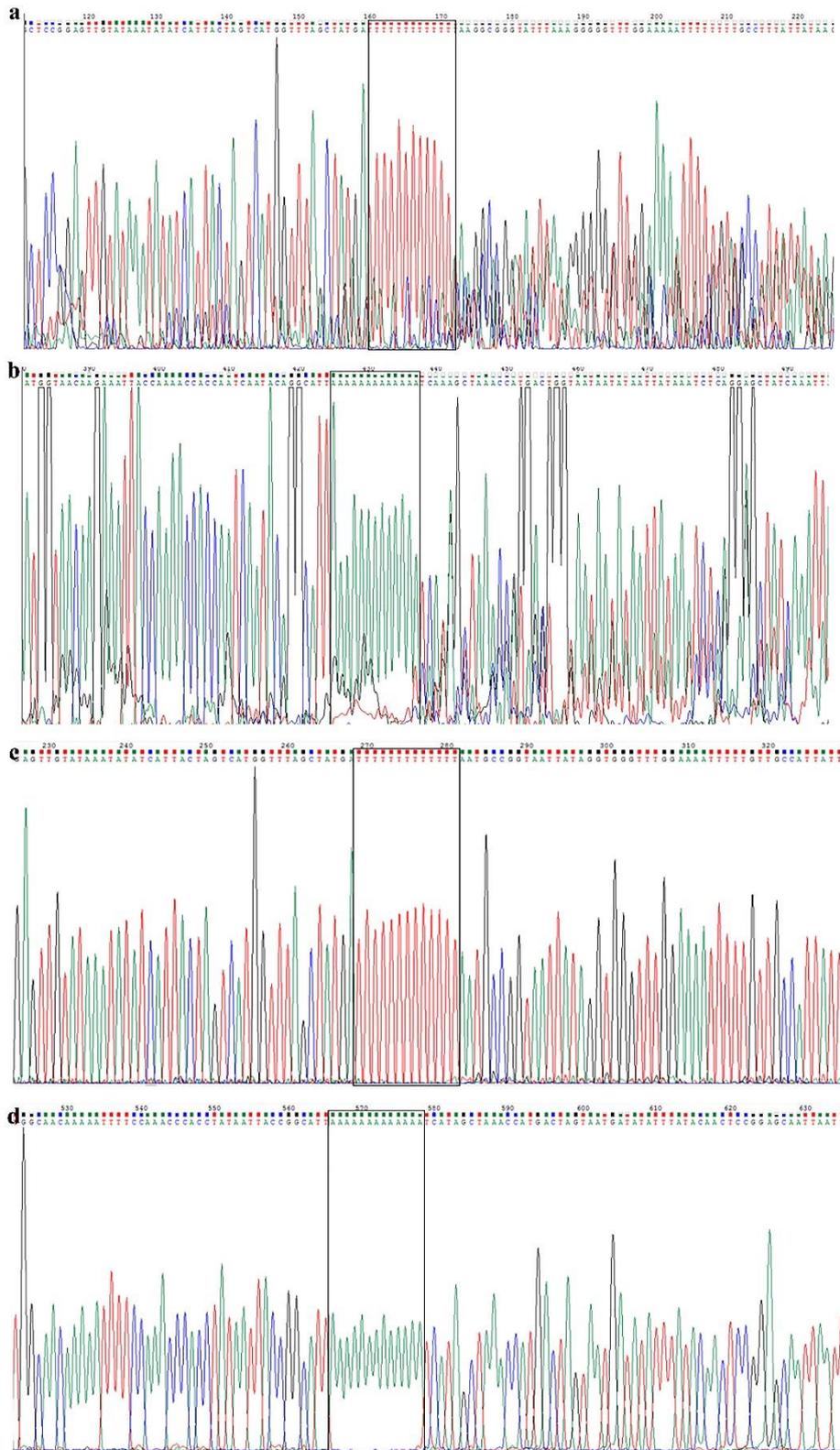


FIGURA 12- Regiões de eletroferogramas de amostras de Diplostomoidea apresentando caudas poli-nucleotídicas **a.** Sequenciamento no sentido “Foward”, evidenciando efeito da presença de cauda poli-T. **b.** Sequenciamento no sentido “Reverse” com cauda Poli-A. **c.** Sequenciamento no sentido “Foward” por obtido por clonagem. **d.** Sequenciamento no sentido “Reverse” obtido por clonagem.

TABELA 8- Dados sobre as sequências parciais dos genes 18s, ITS e COI de trematódeos da família Diplostomidae depositadas no GenBank, utilizadas na construção das árvores filogenéticas. Informações sobre as sequências utilizadas como *outgroup* (*Clinostomum* spp.) são também apresentadas. Abreviaturas: C= cercária, M= metacercária, A= adulto, NI= não informado.

Espécies	Hospedeiros	Estágio evolutivo	Localidade	Número de acesso no GenBank		
				COI	18S	ITS
<i>Austrodiplostomum compactum</i>	<i>Dorosoma cepedianum</i>	M	EUA			KT728782
	<i>Biomphalaria obstructa</i>	C	EUA	KT728783	KT728777	KT728776
		C	EUA		KT728771	KT728766
		C	EUA	KT728788		KT728780
	<i>Phalacrocorax auritus</i>	A	EUA		KT728781	
	<i>Thorichthys callolepis</i>	M	México	KM115964		
	<i>Cichlasoma trimaculatum</i>	M	México	KM115934		
	<i>Dorosoma cepedianum</i>	M	EUA	KT728799		
	<i>Phalacrocorax auritus</i>	A	EUA	KR271028		
	<i>Satanoperca pappaterra</i>	M	Brasil	KR271025		
	<i>Satanoperca jurupari</i>	M	Peru	KR271027		
	<i>Menidia beryllina</i>	M	EUA	KU707940		
		M	EUA	KU707945		
	Diplostomidae sp.	<i>Pomoxis nigromaculatus</i>	M	EUA	KR271029	
<i>Biomphalaria obstructa</i>		C	EUA		KT728774	KT728773
		C	EUA			KT728779
<i>Osmerus mordax</i>	M	Canadá		KM538135		
<i>Diplostomum baeri</i>	<i>Gobio gobio; Oncorhynchus mykiss</i>	M	Alemanha	JX986859		KU725975
	<i>Notemigonus crysoleucas; Catostomus comersoni</i>	M	Canadá	KR271074		GQ292507
<i>Diplostomum huronense</i>	<i>comersoni</i>					
<i>Diplostomum spathaceum</i>	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	M	Islândia	KJ726436		

TABELA 8- Continuação

<i>Diplostomum pseudospathaceum</i>	<i>Lymnaea stagnalis; Larus ridibundus</i>	C; A	República Tcheca	JX986907	KR269766	
<i>Diplostomum mergi</i>	<i>Salmo trutta</i>	M	Alemanha	JX986886		
<i>Diplostomum phroxini</i>	<i>Phoxinus phoxinus</i>	M	Reino Unido		AY222090	
<i>Diplostomum</i> sp. 2	<i>Pimephales notatus</i>	M	Canadá	HM064688		
<i>Diplostomum</i> sp.	<i>Chanodichthys dabryi</i>	M	Canadá	KR271128		
	NI	NI	Noruega	KM212043		
<i>Diplostomum</i> sp. 4	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	M	Canadá			KT186799
<i>Diplostomum</i> sp. 10	<i>Pimephales promelas</i>	M	EUA			KT186788
<i>Hysteromorpha triloba</i>	<i>Notropis hudsonius</i>	M	Canadá			JF769486
	<i>Catostomus commersoni</i>	M	Canadá			HM064925
		M	Canadá	JF769467		HM064927
	<i>Phalacrocorax auritus</i>	A	Canadá	HM064712		
	<i>Notropis hudsonius</i>	M	Canadá	JF769457		
	<i>Squalius cephalus</i>	M	Itália			
	<i>Phalacrocorax auritus</i>	M	México		MF398356	
<i>Posthodiplostomum</i> sp.	<i>Channa argus</i>	M	Japão		AB693170	AB693170
	<i>Channa punctatus</i>	M	Índia		KF738455	
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 1	<i>Ambloplites rupestris</i>	M	Canadá	HM064795		
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 2	<i>Lepomis gibbosus</i>	M	Canadá	HM064798		
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 3	NI	M	Canadá	HM064807	FJ469590	HM064955
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 4	<i>Ardea herodias</i>	A	Canadá	HM064844		
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 5	<i>Lepomis gibbosus</i>	M	Canadá	HM064858		HM064958
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 6	<i>Larus delawarensis</i>	A	Canadá	HM064862		HM064960

TABELA 8- Continuação

<i>Posthodiplostomum</i> sp. 7	<i>Perca flavescens</i>	M	Canadá	HM064865		
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 8	<i>Micropterus salmoides</i>	M	Canadá	HM064876		HM064962
<i>Posthodiplostomum brevicaudatum</i>	<i>Gasterosteus acuelatus</i> ;	M	Bulgária	KX931420		KX931440
	<i>Perca fluviatilis</i>	M	República Tcheca	KX931419		
<i>Posthodiplostomum centrarchi</i>	<i>Lepomis gibbosus</i>	M	Bulgaria	KX931421		KX931441
	<i>Ardea cinerea</i>	A	Espanha	KX931422		
	<i>Lepomis gibbosus</i>	M	Eslováquia	KX931423		
<i>Posthodiplostomum cuticola</i>	<i>Planorbis planorbis</i>	C	Lituânia	KX931424		
<i>Posthodiplostomum minimum</i>	<i>Lepomis macrochirus</i>	M	EUA		KY809062	
<i>Ornithodiplostomum scardinii</i>	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	M	República Tcheca			KX931443
<i>Ornithodiplostomum</i> sp. 1	Cyprinidae sp.; <i>Perca flavescens</i> ; <i>Percina caprodes</i>	M	Canadá	HM064738	FJ469585	HM064936
<i>Ornithodiplostomum</i> sp. 2	<i>Physella gyrina</i> ; <i>Pimephales notatus</i> <i>Notemigonus crysoleucas</i>	C; M M	Canadá Canadá	KT831368 HM064754		HM064939
<i>Ornithodiplostomum</i> sp. 3	<i>Pimephales notatus</i> ; <i>Pimephales promelas</i>	M	Canadá	HM064782		HM064941
<i>Ornithodiplostomum</i> sp. 4	<i>Pimephales notatus</i>	M	Canadá	FJ477212		
<i>Ornithodiplostomum</i> sp. 8	<i>Pimephales promelas</i>	M	Canadá			HM064946
<i>Tylodelphys clavata</i>	<i>Coregonus lavaretus</i>	M	Alemanha	JX986909		JQ665459
<i>Tylodelphys excavata</i>	<i>Planorbarius corneus</i>	C	República Tcheca	KC685344		

TABELA 8- Continuação

<i>Tylodelphys immer</i>	<i>Salvelinus fontinalis</i>	M	Canadá		KT186804
<i>Tylodelphys mashonensis</i>	<i>Clarias gariepinus</i>	M	Tanzânia	KC685328	
<i>Tylodelphys scheuringi</i>	<i>Perca flavescens; Ambloplites rupestris</i>	M	Canadá	HM064912	FJ469596
<i>Tylodelphys</i> sp.	<i>Gobiomorphus cotidianus</i>	M	Nova Zelândia	KU588149	
<i>Tylodelphys</i> sp. 1	<i>Clarias gariepinus</i>	M	Tanzânia	KC685352	
<i>Tylodelphys</i> sp. 2	<i>Clarias gariepinus</i>	M	Tanzânia	KC685358	
<i>Clinostomum complanatum</i>	<i>Heteropneustes fossilis</i>	M	Índia		KF811012
<i>Clinostomum marginatum</i>	<i>Lepomis gibbosus; Ardea alba</i>	M; A	Canadá; México	JF718619	KJ477679

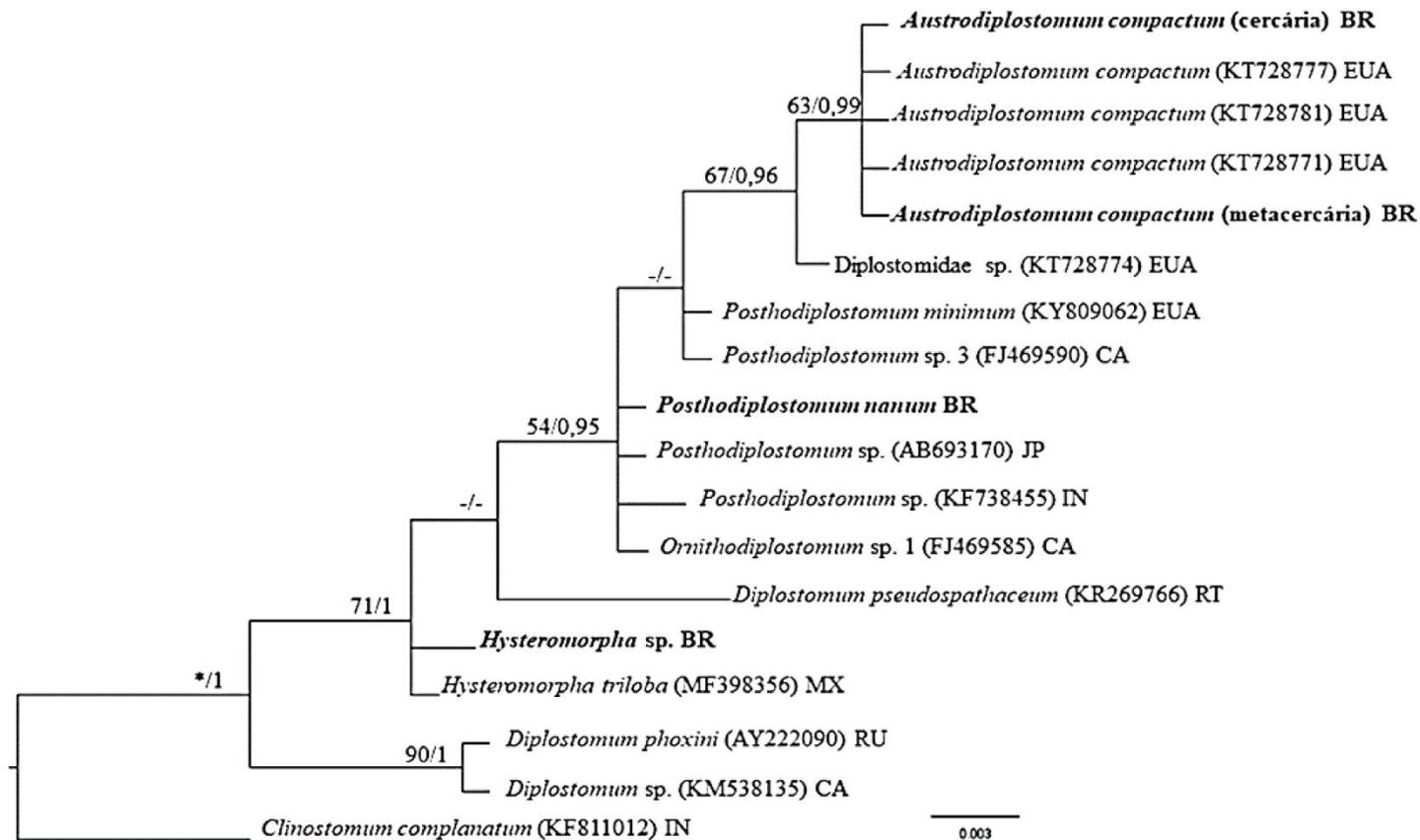


FIGURA 13- Árvore filogenética inferida por Inferência Bayesiana (IB) a partir de sequências parciais do gene nuclear 18S rRNA das amostras da família Diplostomidae obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank. O suporte dos nós é fornecido pelos valores de bootstrap obtido por Máxima Verossimilhança (MV) e probabilidade posterior obtidos por IB (MV/IB). Valores <50 e <0,95 são representados como -. Valores não obtidos por MV são representados por *.

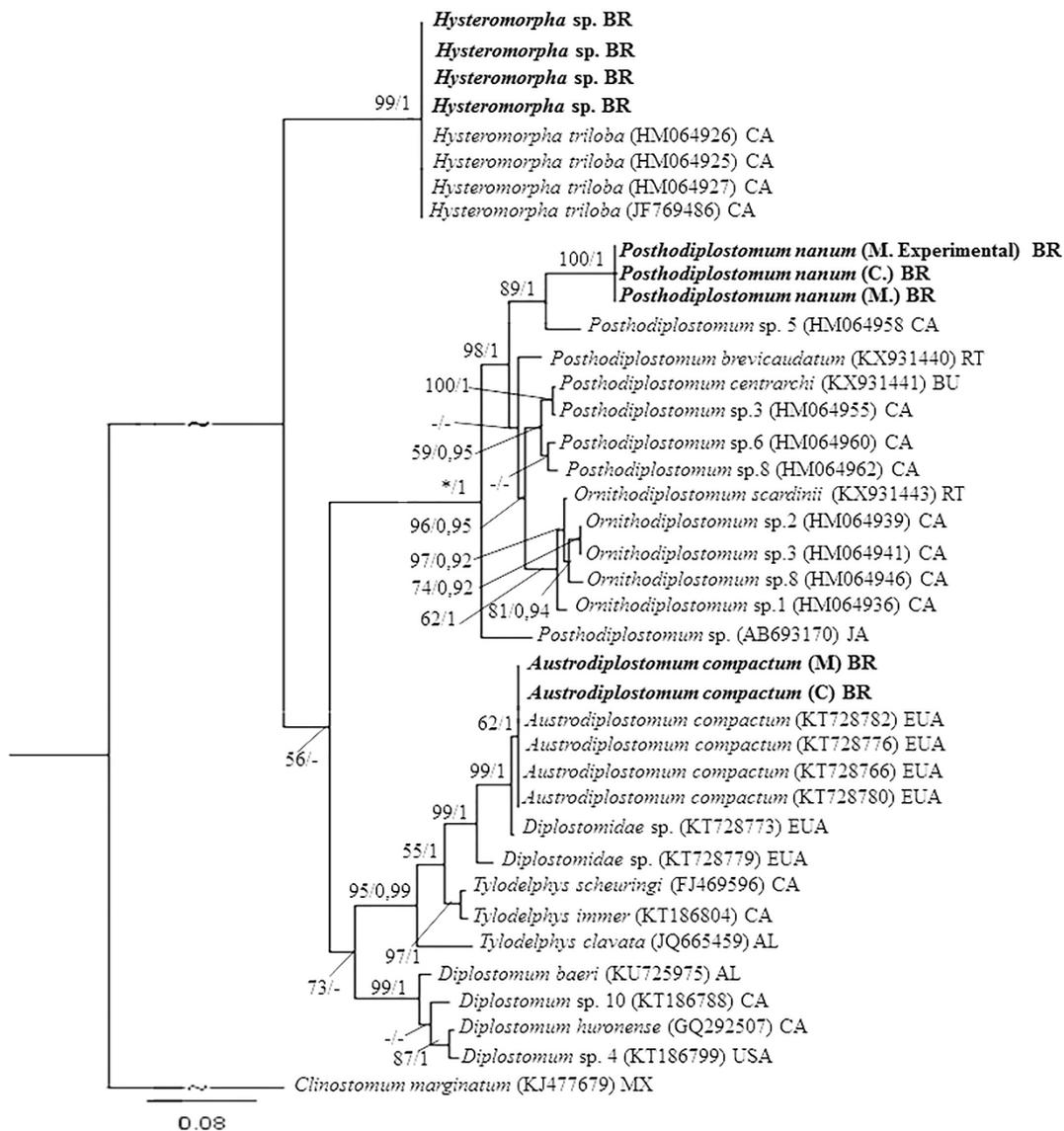


FIGURA 14- Árvore filogenética inferida por Inferência Bayesiana (IB) a partir de sequências da região transcrita espaçadora interna (ITS) das amostras da família Diplostomidae obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank. O suporte dos nós é fornecido pelos valores de bootstrap obtido por Máxima Verossimilhança (MV) e probabilidade posterior obtidos por IB (MV/IB). Valores <50 e <0,95 são representados como -. Valores não obtidos por MV são representados por *.

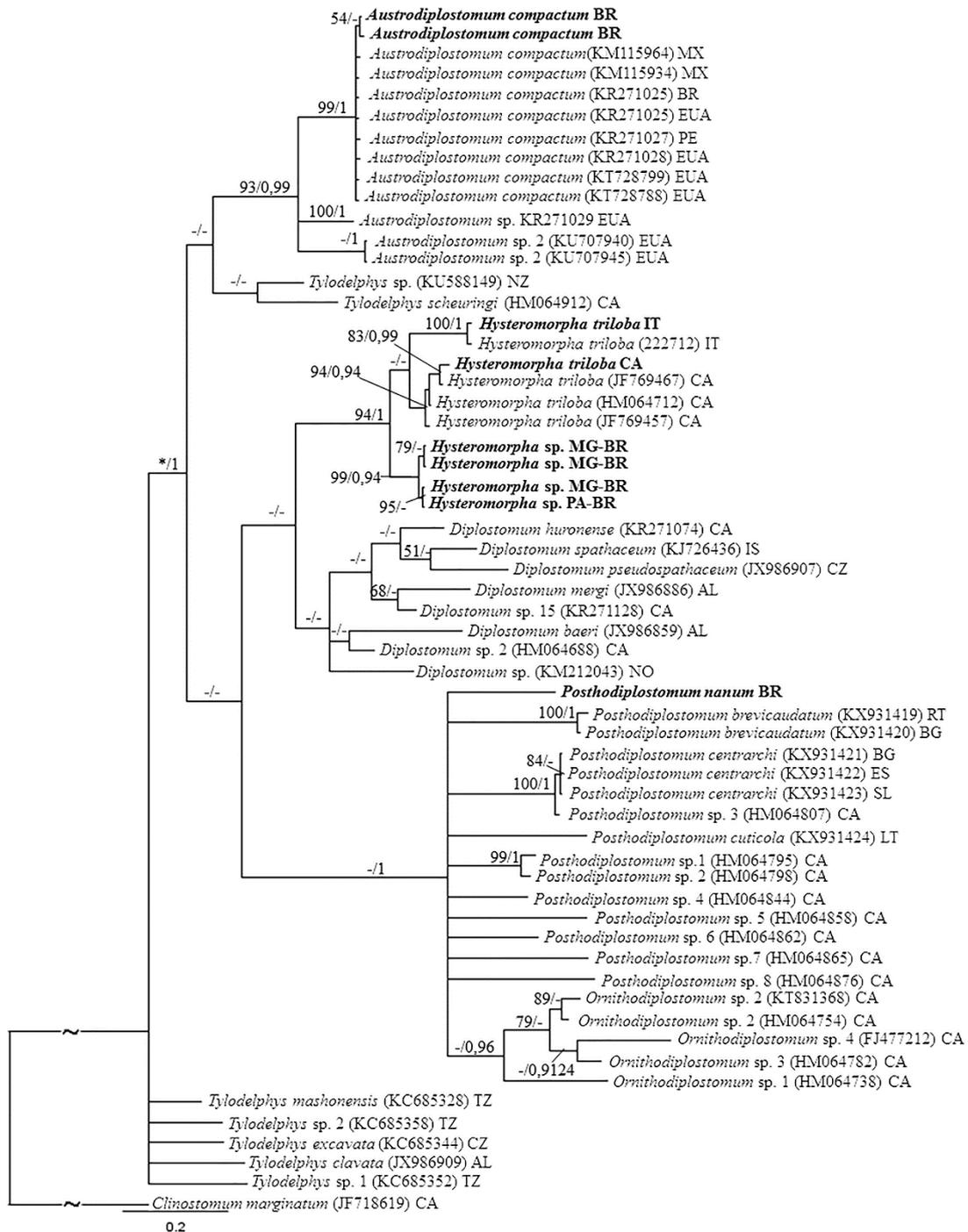


FIGURA 15- Árvore filogenética inferida por Inferência Bayesiana (IB) a partir de sequências do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI) das amostras da família Diplostomidae obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank. O suporte dos nós é fornecido pelos valores de bootstrap obtido por Maxima Verossimilhança (MV) e probabilidade posterior obtidos por IB (MV/IB). Valores <0,95 e <50 são representados como -. Valores não obtidos por MV são representados por *.

5.2.1.3- Caracterização das espécies encontradas

5.2.1.3.1- *Hysteromorpha* sp.

5.2.1.3.1.1- Posição taxonômica

Filo: Platyhelminthes

Subfilo: Neodermata

Classe: Trematoda

Subclasse: Digenea

Ordem: Strigeidida

Subordem: Strigeata

Superfamília: Diplostomoidea Poirier, 1886

Família: Diplostomidae Poirier, 1886

Subfamília: Diplostominae Poirier, 1886

Gênero: *Hysteromorpha* Lutz, 1931

Espécie: *Hysteromorpha* sp.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria straminea*.

Localidades: Lagoa da Pampulha (amostras previamente coletadas) e Lagoa da Cidade Administrativa, Belo Horizonte, MG.

5.2.1.3.1.2- Caracterização morfológica e morfométrica

Cercária: larva do tipo distoma, longifurcada, faringeada (Figura 16a, 16b). Corpo alongado, com dois pares de glândulas de penetração, sendo um par localizado na região pré-acetabular e outro par com disposição para-acetabular. Órgão anterior ovalado, seguido de uma faringe muscular. Esôfago presente, cecos intestinais que se bifurcam na região anterior à ventosa ventral e não se estendem até a parte posterior do corpo. Ventosa ventral localizada na segunda metade do corpo. Tronco caudal sem corpos caudais. Quando em posição de repouso o corpo cercariano apresenta-se curvado ventralmente. As medidas das cercárias de *Hysteromorpha* sp. do presente estudo são apresentadas na Tabela 9.

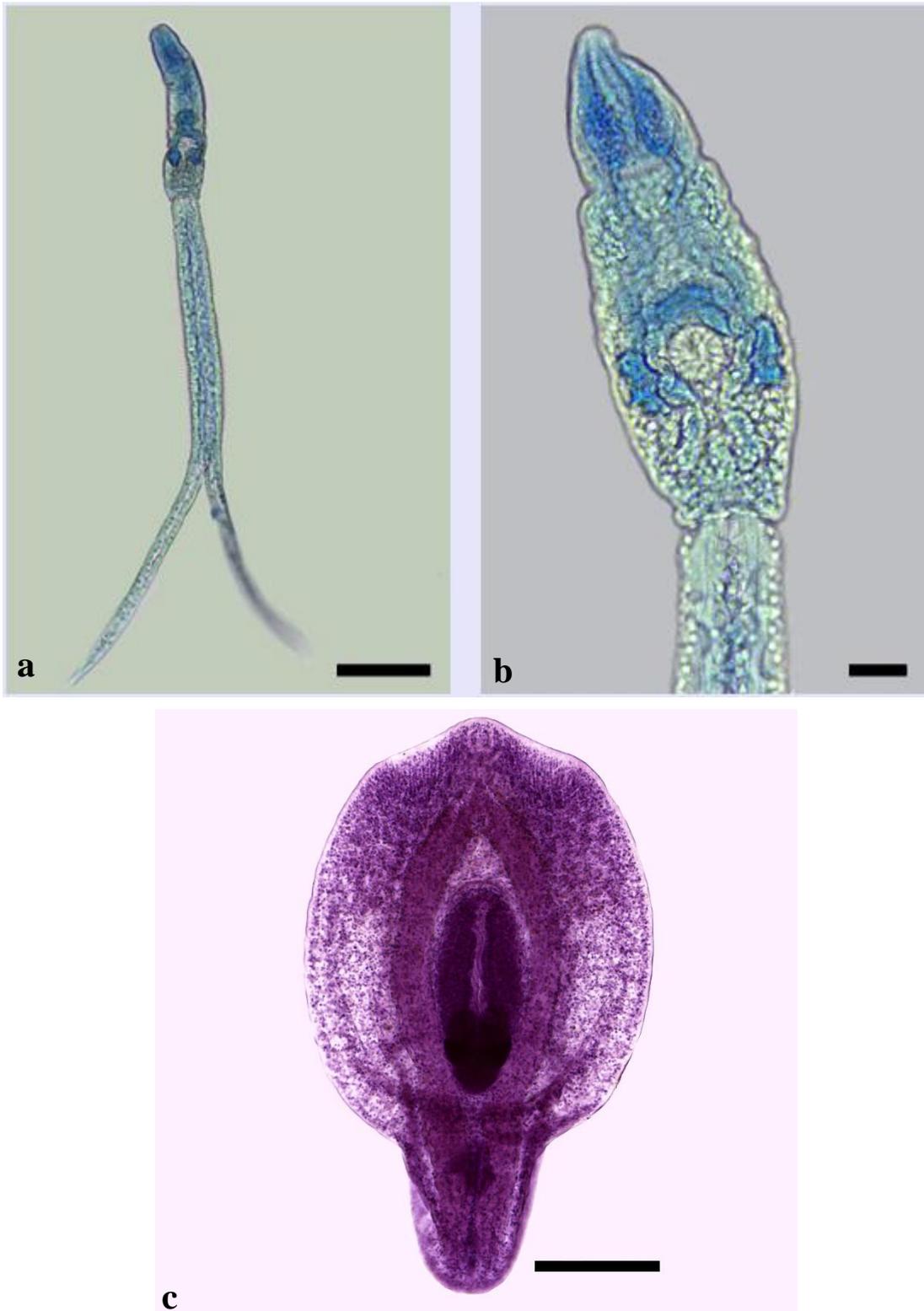


FIGURA 16- *Hsyteromorpha* sp. (a) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* naturalmente infectada coletada na Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. (b) Detalhe do corpo cercariano. (c) Metacercária obtida experimentalmente em *Poecilia reticulata* aos 70 dias de infecção. Escalas: 100 µm (a), 25 µm (b), 200 µm (c).

5.2.1.3.1.3- Estudos experimentais

Cinco exemplares de *P. reticulata* foram expostos a cercárias de *Hysteromorpha* sp. Após uma semana de infecção, 2 exemplares foram examinados, contudo, apresentavam-se negativos. Outros 3 exemplares foram examinados após 70 dias de infecção, tendo sido verificada a presença de 8 metacercárias livres na musculatura de um dos peixes experimentalmente infectados.

Estas metacercárias (Figura 16c) apresentam corpo piriforme, dividido em duas partes, sendo a região anterior do corpo ovalada e a posterior cônica. Na região anterior pode-se evidenciar um par de pseudoventosas, localizadas uma em cada lado da ventosa oral. Faringe pequena, ventosa ventral bem desenvolvida, próxima à bifurcação dos cecos intestinais. Órgão tribocítico bem desenvolvido, longitudinalmente alongado, localizado na metade do corpo. Os cecos intestinais são bastantes evidentes, se iniciando na região anterior a ventosa ventral e se estendendo até a parte posterior do corpo. Os órgãos genitais ainda não se encontravam bem diferenciados na maioria dos exemplares avaliados. As medidas das metacercárias obtidas são apresentadas na Tabela 10.

TABELA 9- Medidas (em μm) das cercárias de *Hysteromorpha* sp. encontradas em *Biomphalaria straminea* em Belo Horizonte, e dados relatados para larvas de *Hysteromorpha triloba* por outros autores. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura.

Espécies		<i>Hysteromorpha</i> sp.	<i>Hysteromorpha triloba</i>	<i>H. triloba</i>
Localidade		Brasil	EUA	Brasil
Referência		Presente estudo	Hughins, 1954	Pinto, 2013
Hospedeiro		<i>Biomphalaria straminea</i>	<i>Gyraulus hirsutus</i>	<i>B. straminea</i>
Corpo	Co	187 \pm 18 (137-206)	196 (168-221)	175 \pm 15 (143-205)
	L	51 \pm 11 (34-69)	45 (41-50)	44 \pm 4 (37-53)
Cauda	Co	231 \pm 26 (192-274)	237 (226-260)	236 \pm 16 (205-266)
	L	37 \pm 6 (27-48)	36 (28-42)	38 \pm 3 (33-47)
Órgão anterior	Co	32 \pm 7 (14-41)	50 (42-53)	46 \pm 5 (33-58)
	L	27 \pm 5 (21-34)	24 (20-28)	26 \pm 1 (23- 28)
Ventosa ventral	Co	30 \pm 5 (27-41)	18 (17-20)	18 \pm 1 (17-20)
	L	28 \pm 8 (21-41)	—	18 \pm 2 (15-23)
Furcas	Co	221 \pm 15 (205-267)	216 (196-227)	213 \pm 15 (184-239)
	L	16 \pm 4 (14-27)	—	22 \pm 3 (17-27)

TABELA 10- Dados morfométricos de metacercárias de *Hysteromorpha* sp. obtidas experimentalmente de *Poecilia reticulata*, e medidas relatadas para *Hysteromorpha triloba* por outros autores. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura.

Espécie		<i>Hysteromorpha</i> sp.	<i>H. triloba</i>	<i>H. triloba</i>
Referência		Presente estudo	Hughes, 1929	Huggins, 1954
Localidade		Brasil	EUA	EUA
Hospedeiros		<i>Poecilia reticulata</i>	<i>Ameirus melas</i>	<i>Poecilia reticulata</i>
Corpo	Co	822 ± 157 (617-1097)	810	1,52
	L	551 ± 62 (494-686)	475	45
Ventosa oral	Co	57 ± 12 (48-82)	25	—
	L	54 ± 13 (41-69)	67	—
Ventosa ventral	Co	37 ± 9 (27-55)	76	—
	L	36 ± 11 (21-55)	—	—
Faringe	Co	37 ± 7 (34-48)	45	—
	L	31 ± 4 (27-34)	33	—
Órgão tribocítico	Co	273 ± 38 (206-315)	—	—
	L	133 ± 4 (130-137)	—	—

5.2.1.3.1.4- Estudos moleculares

A análise molecular realizada a partir de sequências parciais do gene 18S revelou proximidade entre a amostra brasileira de *Hysteromorpha* sp. com um isolado de *H. triloba* obtido no México, sendo verificada diferença molecular de 0,3% (Tabela 11). Além disso, as sequências de *Hysteromorpha* spp. diferem significativamente de *Posthodiplostomum* spp. (1,2-1,5%), *Austrodiplostomum* spp. (2,1%), *Diplostomum* spp. (1,8-2,4%) e *Ornithodiplostomum* (1,2%). A árvore filogenética obtida através da análise de sequências 18S é apresentada na Figura 13 e revela o agrupamento, com um significativo suporte, entre nossa amostra de *Hysteromorpha* sp. e *H. triloba*. Estes isolados se encontram em um clado distinto em relação às espécies dos gêneros listados acima. As sequências obtidas para o marcador ITS também corroboraram a identificação de *Hysteromorpha* sp., que se agrupou em um mesmo clado com isolados de *H. triloba* do Canadá (Figura 14). Não foram verificadas diferenças moleculares para este marcador entre *Hysteromorpha* sp. e *H. triloba*, sugerindo coespecificidade. A comparação com outros gêneros considerados nas análises revelou que *Hysteromorpha* spp. apresentam-se em um clado distinto com significativas diferenças em relação a espécies do gênero *Diplostomum* (13,1 -15,5%) (Tabela 12).

Os resultados obtidos com a análise das sequências COI não suportaram a coespecificidade entre *Hysteromorpha* sp. e *H. triloba* sugerida pelo uso de marcadores nucleares. As amostras de *Hysteromorpha* spp. agruparam-se em um clado distinto em relação a outros diplostomídeos considerados nas análises (Figura 15). Contudo, as amostras de *Hysteromorpha* se separaram em 3 subclados (com significativo suporte) de acordo com a área geográfica dos parasitos. Os dados de comparação pareada entre as sequências de *Hysteromorpha* spp. e *Diplostomum* spp. são apresentados na Tabela 13. As diferenças verificadas entre os isolados brasileiros aqui identificados como *Hysteromorpha* sp. foram de 0,0-0,9%. Valores semelhantes foram verificados entre isolados de *H. triloba* da América do Norte (0,9-1,7%) e da Europa (0,3%). Os resultados sugerem que *Hysteromorpha* sp. do Brasil é uma espécie críptica, tendo em vista as diferenças moleculares em relação aos isolados de *H. triloba* do Canadá (6,0-6,3%) e Itália (8,3-8,6%). Entre estes isolados identificados como *H. triloba*, foram verificadas diferenças de 6,9-8,3%, sugerindo que também são espécies diferentes. A diferença entre as espécies do gênero *Diplostomum* e *Hysteromorpha* foi de 11,7-18,3%.

TABELA 11- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene 18S rRNA obtidas para três espécies de trematódeos da família Diplostomidae obtidas no presente trabalho (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank para espécies relacionadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 <i>Austrodiplostomum compactum</i> (Cercária) BR																
2 <i>Austrodiplostomum compactum</i> (Metacercária) BR	0,0															
3 <i>Austrodiplostomum compactum</i> (KT728777) EUA	0,0	0,0														
4 <i>Austrodiplostomum compactum</i> (KT728771) EUA	0,0	0,0	0,0													
5 <i>Austrodiplostomum compactum</i> (KT728781) EUA	0,0	0,0	0,0	0,0												
6 <i>Hysteromorpha</i> sp. (Cercária) BR	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1											
7 <i>Hysteromorpha triloba</i> (MF398356) MX	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	0,3										
8 <i>Posthodiplostomum nanum</i> (Cercária) BR	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	0,9									
9 <i>Posthodiplostomum minimum</i> (KY809062) EUA	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	1,5	1,2	0,3								
10 <i>Posthodiplostomum</i> sp. (AB693170) JA	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	0,9	0,0	0,0							
11 <i>Posthodiplostomum</i> sp. (KF738455) IN	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,2	0,3	0,6	0,3						
12 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 3 (FJ469590) CA	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	1,5	1,2	0,3	0,0	0,3	0,6					
13 <i>Diplostomum phoxini</i> (AY222090) RU	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,4	2,1	2,7	2,4	2,7	2,4	2,4				
14 <i>Diplostomum pseudospathaceum</i> (KR269766) RT	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,1	1,8	2,1	2,4	2,1	2,4	2,4	2,4			
15 Diplostomidae sp. (KT728774) EUA	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	1,8	1,5	0,9	0,6	0,9	1,2	0,6	2,4	2,1		
16 <i>Diplostomum</i> sp. (KM538135) CA	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,4	2,1	2,7	2,4	2,7	2,4	2,4	0,0	2,4	2,4	
17 <i>Ornithodiplostomum</i> sp.1 (FJ469585) CA	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	0,9	0,0	0,3	0,0	0,3	0,3	2,7	2,1	0,9	2,7

TABELA 12- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências da região espaçadora transcrita interna (ITS) de *Hysteromorpha* sp. obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank para *Hysteromorpha triloba*, *Diplostomum* spp. e Diplostomidae sp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>Hysteromorpha</i> sp. (Cercária) BR													
2 <i>Hysteromorpha</i> sp. (Cercária) BR	0,0												
3 <i>Hysteromorpha</i> sp. (Cercária) BR	0,0	0,0											
4 <i>Hysteromorpha</i> sp. (Cercária) BR	0,0	0,0	0,0										
5 <i>Hysteromorpha triloba</i> (HM064926) CA	0,0	0,0	0,0	0,0									
6 <i>Hysteromorpha triloba</i> (HM064925) CA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0								
7 <i>Hysteromorpha triloba</i> (HM064927) CA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0							
8 <i>Hysteromorpha triloba</i> (JF769486) CA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
9 <i>Diplostomum baeri</i> (KU725975) AL	13,1	13,1	13,1	13,1	13,1	13,1	13,1	13,1					
10 <i>Diplostomum huronense</i> (GQ292507) CA	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	2,1				
11 Diplostomidae sp. (KT728773) EUA	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	11,5	11,1			
12 Diplostomidae sp. (KT728779) EUA	14,7	14,7	14,7	14,7	14,7	14,7	14,7	14,7	11,1	10,8	2,7		
13 <i>Diplostomum</i> sp. 4 (KT186799) EUA	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	2,1	0,7	11,4	11,0	
14 <i>Diplostomum</i> sp. 10 (KT186788) CA	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	2,1	2,0	11,1	10,6	2,4

TABELA 13- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) de *Hysteromorpha* spp. obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de *Diplostomum* spp. disponíveis no GenBank.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 <i>Hysteromorpha</i> sp. MG-BR																	
2 <i>Hysteromorpha</i> sp. MG-BR	0,0																
3 <i>Hysteromorpha</i> sp. MG-BR	0,9	0,9															
4 <i>Hysteromorpha</i> sp. PA-BR	0,9	0,9	0,0														
5 <i>Hysteromorpha triloba</i> (JF769467) CA	6,9	6,9	6,6	6,6													
6 <i>Hysteromorpha triloba</i> (HM064712) CA	6,9	6,9	6,6	6,6	2,3												
7 <i>Hysteromorpha triloba</i> CA	6,3	6,3	6,0	6,0	2,3	0,9											
8 <i>Hysteromorpha triloba</i> (JF769457) CA	6,6	6,6	6,3	6,3	0,9	1,4	1,7										
9 <i>Hysteromorpha triloba</i> IT	8,9	8,9	8,6	8,6	8,0	6,9	6,9	7,7									
10 <i>Hysteromorpha triloba</i> (222712) IT	8,6	8,6	8,3	8,3	8,3	7,2	7,2	8,0	0,3								
11 <i>Diplostomum baeri</i> (JX986859) AL	16,0	16,0	15,8	15,8	16,9	17,8	17,5	16,9	18,3	18,1							
12 <i>Diplostomum huronense</i> (KR271074) CA	12,9	12,9	12,9	12,9	14,6	14,0	13,5	14,3	14,0	14,0	12,3						
13 <i>Diplostomum mergi</i> (JX986886) AL	14,6	14,6	15,2	15,2	14,6	14,6	13,8	14,3	14,0	13,8	15,2	10,3					
14 <i>Diplostomum pseudospathaceum</i> (JX986907) RT	14,6	14,6	15,2	15,2	15,2	14,9	14,6	14,9	16,0	15,8	14,6	10,9	11,7				
15 <i>Diplostomum spathaceum</i> (KJ726436) IS	13,5	13,5	13,5	13,5	14,6	15,2	14,9	14,6	15,2	14,9	14,0	8,0	10,6	8,3			
16 <i>Diplostomum</i> sp. (KM212043) NO	11,7	11,7	12,3	12,3	14,6	14,6	14,0	14,0	14,0	14,0	13,8	10,0	12,0	13,2	12,3		
17 <i>Diplostomum</i> sp. 2 (HM064688) CA	11,2	11,2	11,7	11,7	12,0	12,6	12,0	11,7	12,6	12,3	10,3	10,6	10,3	11,5	11,7	10,0	
18 <i>Diplostomum</i> sp. 15 (KR271128) CA	12,6	12,6	12,6	12,6	13,5	13,5	12,6	12,9	14,0	13,8	13,8	7,7	6,9	9,7	8,9	11,2	9,2

5.2.1.3.2- *Posthodiplostomum nanum* Dubois, 1937

5.2.1.3.2.1- Posição taxonômica

Filo: Platyhelminthes

Subfilo: Neodermata

Classe: Trematoda

Subclasse: Digenea

Ordem: Strigeidida

Subordem: Strigeata

Superfamília: Diplostomoidea Poirier, 1886

Família: Diplostomidae Poirier, 1886

Subfamília: Crassiphialinae Sudarikov, 1960

Gênero: *Posthodiplostomum* Dubois, 1936

Espécie: *Posthodiplostomum nanum* Dubois, 1937

Hospedeiro intermediário: *Gudlachia ticaga*.

Localidade: Lagoa do Nado, Belo Horizonte, MG.

5.2.1.3.2.2- Caracterização morfológica e morfométrica

Cercária: Larva do tipo monostoma, longifurcada, faringeada, com ocelos pigmentados (Figura 17a e 17b). Corpo alongado com ocelos na região mediana, três pares de glândulas de penetração localizadas na metade posterior do corpo. Órgão anterior ovalado. Na posição de repouso a cercária mantém o corpo curvado e as furcas ficam dispostas em um ângulo de 90° em relação ao tronco caudal. As medidas das cercárias são apresentadas na Tabela 14 juntamente com medidas de larvas semelhantes descritas por diferentes autores.

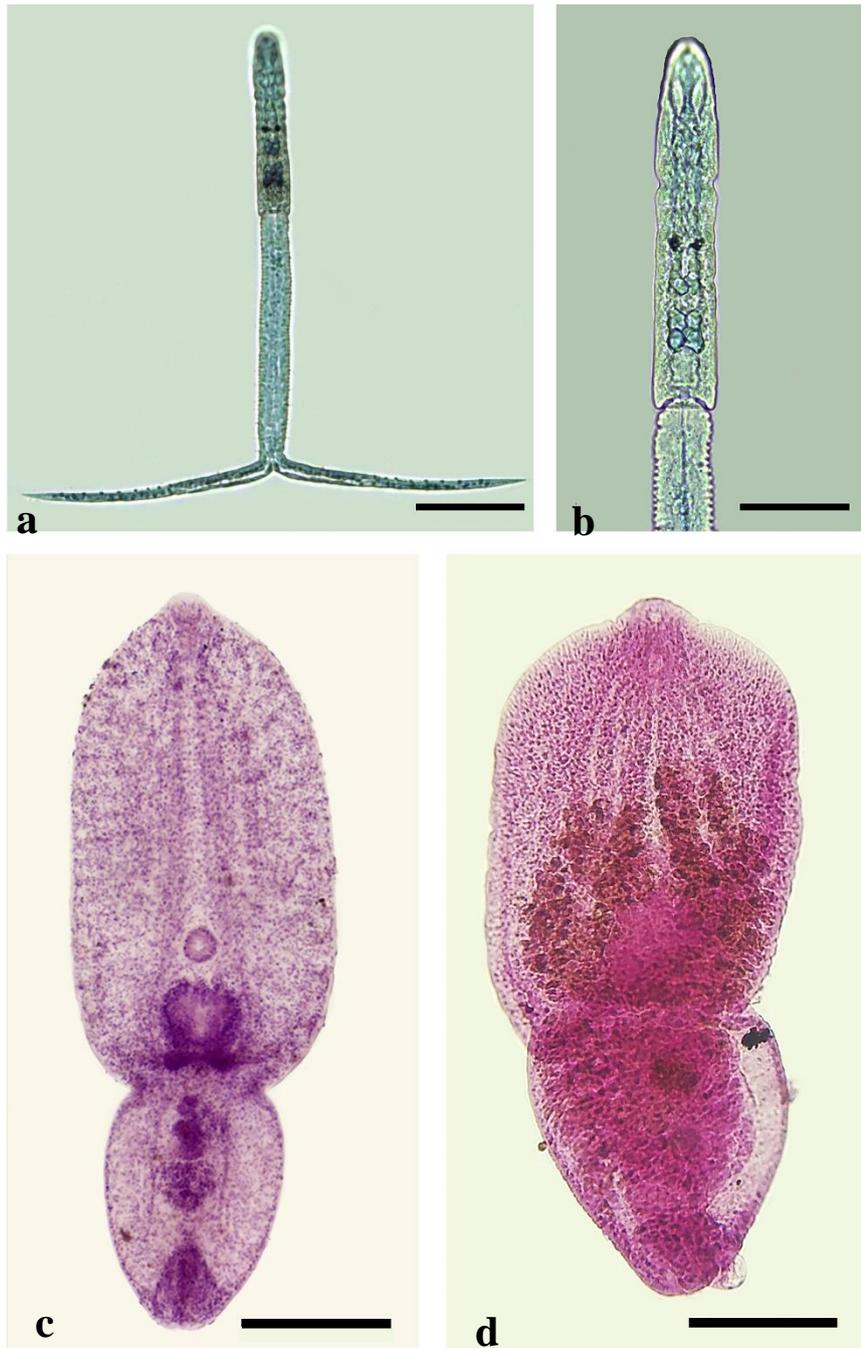


FIGURA 17- *Posthodiplostomum nanum*: (a) Cercária emergida de *Gundlachia ticaga* coletada no Parque Lagoa do Nado, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. (b) Detalhe do corpo da cercária. (c) Metacercária recuperada na cavidade corporal de *Poecilia reticulata* infetado experimentalmente. (d) Parasito adulto recuperado em camundongo experimentalmente infectado. Escalas: 100 μm (a), 50 μm (b) e 200 μm (c, d).

5.2.1.3.2.3- Estudos experimentais

Metacercárias (Figura 17c) foram obtidas com sucesso em *P. reticulata* experimentalmente infectados. Cistos foram encontrados na cavidade corporal dos peixes, sendo verificada uma intensidade média de infecção de 10,4 (5-17) metacercárias. As metacercárias obtidas apresentam corpo dividido em duas partes, com a região anterior ovalada e a posterior claviforme. Órgão tribocítico ovalado, com uma fenda mediana. Ventosa oral subterminal. Faringe pequena. Ventosa ventral pequena, localizada anteriormente ao órgão tribocítico. Os primórdios dos órgãos genitais ainda não estão completamente diferenciados em todas as metacercárias. As medidas das metacercárias obtidas experimentalmente no presente estudo são comparadas com as relatadas para *Posthodiplostomum* spp. por diferentes autores (Tabela 15).

Em relação às tentativas de infecção experimental de hospedeiros definitivos, um parasito adulto (Figura 17d) foi recuperado no terço posterior do intestino delgado de um dos camundongos infectados. A infecção de *G. g. domesticus* não resultou em sucesso. O adulto apresenta o corpo dividido em duas regiões. Ventosa oral subterminal, muscular. Faringe muscular, menor que a ventosa oral. Esôfago ausente. Cecos intestinais estendendo-se até a região posterior do corpo. Ventosa ventral presente, maior que a ventosa oral. Órgão tribocítico pós-acetabular e pré-testicular. Dois testículos, o anterior ovalado e o posterior reniforme, ocupando quase toda a largura do corpo. Ovário pequeno, pós-acetabular, ao lado do testículo anterior. Vitelária localizada na região anterior do corpo ao redor da ventosa ventral e do órgão tribocítico. Bolsa copuladora e poro genital presentes, localizados na região posterior do corpo. O exemplar recuperado ainda não apresentava ovos. As medidas do adulto obtido em camundongo são apresentadas na Tabela 16.

TABELA 14- Dados morfométricos das cercárias de *Posthodiplostomum nanum* encontradas em *Gundlachia ticaga* em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, e dados relatados por outros autores para *Posthodiplostomum* spp. na América do Sul. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura.

Espécies		<i>Posthodiplostomum nanum</i>	<i>P. nanum</i>	<i>Posthodiplostomum</i> sp.
Referência		Presente estudo	Ostrowski de Núñez, 1973	Rittosa <i>et al.</i> , 2013
Localidade		Brasil	Argentina	Argentina
Hospedeiro		<i>Gundlachia ticaga</i>	<i>Uncancylus concentricus</i>	<i>Anysancylus obliquus</i>
Corpo	Co	155 ± 6 (144-164)	148-190	219,8 (192-240)
	L	22 ± 2 (14-21)	32	44,6 (38-58)
Órgão anterior	Co	14 ± 2 (14-21)	—	—
	L	14 ± 2 (14-21)	—	—
Tronco caudal	Co	180 ± 29 (137-213)	190-243	307,7 (221-365)
	L	20 ± 8 (7-34)	21	35,5 (19-48)
Furcas	Co	184 ± 13 (144-206)	190-212	244,8 (182-317)
	L	9 ± 5 (7-27)	10	21,6 (10-29)

TABELA 15- Dados morfométricos de metacercárias de *Posthodiplostomum nanum* obtidas experimentalmente de *Poecilia reticulata* e medidas de *Posthodiplostomum* spp. relatadas em peixes na América do Sul por diferentes autores. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura.

Espécies		<i>P. nanum</i>	<i>P. nanum</i>	<i>Posthodiplostomum</i> sp.
Refêrencia		Presente estudo	Pinto & Melo, 2012	Rittosa <i>et al.</i> , 2013
Localidade		Brasil	Brasil	Argentina
Hospedeiro		<i>Poecilia reticulata</i>	<i>Poecilia reticulata</i>	<i>Galaxias maculatus</i>
Corpo	Co	820 ± 78 (686-932)	1.049 ± 83 (911-1.117)	672 (566-777)
	L	282 ± 43 (206-391)	478 ± 28 (447-516)	194,8 (134-278)
Região anterior	Co	541 ± 63 (439-617)	—	291,8 (240-346)
	L	281 ± 44 (206-391)	—	—
Região posterior	Co	279 ± 39 (199-357)	—	—
	L	174 ± 37 (117-247)	—	—
Ventosa oral	Co	32 ± 4 (27-41)	43 ± 5 (38-51)	37,3 (29-43)
	L	31 ± 6 (21-41)	39 ± 4 (34-43)	26,0 (19-34)
Ventosa ventral	Co	37 ± 5 (27-48)	60 ± 15 (43-77)	40,4 (34-48)
	L	37 ± 5 (27-48)	63 ± 13 (48-77)	30,8 (22-41)
Faringe	Co	26 ± 5 (21-34)	—	25,4 (14-31)
	L	25 ± 5 (21-34)	—	20,2 (10-29)
Órgão tribocítico	Co	78 ± 11 (62-103)	176 ± 20 (150-205)	77,8 (62-96)
	L	90 ± 13 (69-117)	184 ± 20 (157-205)	87,5 (60-125)
Testículo anterior	Co	46 ± 15 (27-82)	—	53,3 (38-74)
	L	41 ± 10 (27-62)	—	58,6 (38-79)
Testículo posterior	Co	60 ± 14 (34-75)	—	62,4 (43-74)
	L	47 ± 15 (27-69)	—	73,7 (48-113)
Ovário	Co	21 ± 4 (14-28)	—	24,9 (19-34)
	L	25 ± 8 (21-41)	—	29,4 (19-53)

TABELA 16- Dados morfométricos de *Posthodiplostomum nanum* obtido experimentalmente em camundongos e medidas de *Posthodiplostomum* spp. relatados por diferentes autores na América do Sul. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura.

Espécie Referência	<i>P. nanum</i> Presente estudo	<i>P. nanum</i> Dubois (1970)	<i>P. nanum</i> Ostrowski de Nuñez (1973)	<i>P. nanum</i> Digiani (2000)	<i>P. nanum</i> Pinto <i>et al.</i> (2013d)	<i>Posthodiplostomum</i> sp. Ritossa <i>et al.</i> (2013)	<i>P. grande</i> Dubois, (1938)	<i>P. macrocotyle</i> Brandão <i>et al.</i> (2013)	<i>P. microsicya</i> Dubois (1938)	
Localidade Hospedeiro	Brasil <i>Mus musculus</i>	Brasil <i>Butorides striata</i>	Argentina Patos	Argentina <i>Plegadis chihi</i>	Brasil <i>Butorides striata</i>	Argentina <i>Gallus gallus domesticus</i>	Brasil <i>Butorides striata</i>	Brasil <i>Spheniscus magellanicus</i>	Brasil <i>Botaurus pinnatus</i>	
Corpo	Co	816	“Até 950”	551-636	436 (396-483)	1.021 (751-1 256)	1.022 (852-1 193)	1.620-2.250	1.192-1.529	1.630-1.950
	L	336	—	—	—	499 (280-669)	475,7 (398-540)	—	—	—
Região anterior	Co	343	250-540	391-477	279 (237-333)	—	590,3 (499-624)	960-1.560	745-894	1.100-1.400
	L	274	140-160	233-254	189 (159-222)	—	—	—	317-425	350-380
Região posterior	Co	473	160-410	190-243	157 (116-193)	—	466,8 (384-595)	720-930	447-635	530-570
	L	336	90-380	148-159	142 (97-179)	—	—	—	259-386	220-240
Ventosa oral	Co	34	26-60	37-40	27 (24-39)	54 (45-62)	56,4 (48-67)	55-75	57-72	18
	L	34	24-47	32-27	25 (19-34)	50 (42-53)	48	55-83	59-75	18
Ventosa ventral	Co	48	24-46	40-43	32 (29-36)	52 (42-62)	57 (41-67)	82-100	84-102	40
	L	48	30-60	45-54	—	54 (42-67)	70,8 (53-96)	95-105	69-98	53-54
Faringe	Co	27	24-54	27-29	27 (26-31)	52 (42-58)	40,8 (29-48)	65-75	54-65	23-29

TABELA 16- *Continuação...*

Espécie		<i>P. nanum</i>	<i>Posthodiplostomum</i> sp.	<i>P. grande</i>	<i>P. macrocotyle</i>	<i>P. microsicya</i>				
Órgão. Tribocítico	L	21	18-46	21-27	18 (14-31)	32 (25-40)	37,2 (29-38)	55-83	33-47	15-18
	Co	137	43-76	72-116	60 (55-70)	128 (96-171)	110 (77-154)	290-400	215-224	200-230
Testículo superior	L	103	60-96	62-64		146 (82-197)	164,4 (134-221)	200-405	174-226	200-230
	Co	41	45-145	78-91	40 (31-53)	182 (116-266)	149,5 (77-211)	160-230	108-163	145-160
Testículo inferior	L	69	55-165	43-54	99 (53-133)	246 (130-341)	171,1 (67-221)	170-275	102-173	180
	Co	171	55-175	43-54	34 (27-43)	64 (48-102)	146,7 (86-202)	—	135-286	215-220
Ovário	L	103	82-186	116-148	89 (51-120)	103 (68-130)	353,8 (307-403)	—	207-334	210
	Co	41	24-73	27-48	36 (24-48)	143 (48-205)	82,1 (67-96)	170	52-76	72
	L	48	29-120	40-54	54 (48-67)	166 (82-239)	110,9 (96-125)	100	43-72	90

5.2.1.3.2.4- Estudos moleculares

Os resultados obtidos pela análise do fragmento do gene 18S utilizado no presente estudo não possibilitou uma separação evidente entre *P. nanum* e outras espécies dos gêneros *Posthodiplostomum* e *Ornithodiplostomum*. A árvore filogenética obtida com este marcador é apresentada na Figura 13 e a comparação pareada entre as sequências obtidas no presente estudo e outras disponíveis no GenBank se encontra na Tabela 11. Foi verificado que a diferença entre *P. nanum* e *Posthodiplostomum* spp. variou entre 0,0-1,2%, sendo as sequências aqui obtidas idênticas a um isolado de *Posthodiplostomum* sp. do Japão, e diferindo em apenas 1 nucleotídeo de isolados do Canadá, Inglaterra e EUA. Além disso, não foram verificadas diferenças em relação a *Ornithodiplostomum* sp. 1. Considerando-se outros gêneros, diferenças significativas foram encontradas entre *P. nanum* e *Austrodiplostomum* spp. (1,2%), *Diplostomum* spp. (2,1-2,7%) e *Hysteromorpha* spp. (1,5%). Nenhuma das amostras deste grupo se agruparam nos clados correspondentes aos outros gêneros avaliados.

Os dados moleculares obtidos com o uso de sequências ITS permitiram uma melhor resolução em relação às espécies do gênero *Posthodiplostomum*. A árvore filogenética obtida (Figura 14) demonstra que as duas sequências de *P. nanum* do Brasil são idênticas, não existindo sequências semelhantes depositadas no GenBank. Esta amostra agrupou-se em um mesmo clado com *Posthodiplostomum* sp. 5 do Canadá, contudo, a diferença entre estes isolados é de 6,0%, sugerindo que são espécies distintas. As sequências obtidas para *P. nanum* diferem significativamente das outras espécies de *Posthodiplostomum* (6,0-9,3%), *Ornithodiplostomum* spp. (7,7-8,3%) e de *M. pricei* (6,7%) (Tabela 17). Os resultados das análises filogenéticas utilizando-se a região ITS sugere fortemente a parafilia do gênero *Posthodiplostomum*. A diferença entre *P. nanum* e as diferentes espécies de *Posthodiplostomum* consideradas em nossa análise foi de 6,0-9,3%. Curiosamente, a diferença interespecífica conhecida para espécies de *Ornithodiplostomum*, gênero relacionado e monofilético de acordo com as nossas análises, é significativamente inferior (0,0-2,1%). Foi verificado agrupamento de *M. pricei*, anteriormente identificado com *Posthodiplostomum* sp. 6, em um clado, com significativo suporte, juntamente como *Posthodiplostomum* sp. 8 e *P. centrarchi*. A diferença verificada para a região ITS entre as espécies presente neste clado (0,9-1,7%) sugere fortemente que se trata de espécies cogenéticas. Uma outra espécie, *P.*

brevicaudatum difere 3.2% de *M. pricei* e 3.6% de *P. centrarchi*, sendo possível que pertençam a um mesmo gênero.

Os resultados obtidos com a análise de sequências COI revelaram que nossa amostra de *P. nanum* agrupou-se em um clado contendo várias amostras de *Posthodiplostomum* spp., além de *M. pricei* e *Ornithodiplostomum* spp. (Figura 15). Contudo, as relações entre as espécies dentro deste clado não foram bem resolvidas, exceto para *Ornithodiplostomum* spp., e *Posthodiplostomum* sp. 1 e *Posthodiplostomum* sp. 2 que se agruparam com um significativo suporte. Uma outra consideração importante é que a espécie tipo do gênero, *P. cuticola*, não se agrupou neste clado, corroborando os resultados obtidos pela análise de sequências ITS no que diz respeito a parafilía do gênero. O isolado de *P. nanum* do presente estudo apresentou diferenças de 13,1-20,1% em relação aos outros isolados de *Posthodiplostomum*. Além disso, esta espécie difere de *Ornithodiplostomum* spp. (13,1-15,3%) e de *M. pricei* (14,3%).

Em relação aos outros táxons utilizados nas análises moleculares, verificou-se que os isolados de *P. brevicaudatum* da Bulgária e da República Tcheca se agruparam em um mesmo clado e a diferença intraespecífica foi de 1,9%. Do mesmo modo, *P. centrarchi* da Bulgária, Espanha, Eslováquia e Canadá agruparam-se no mesmo clado sem diferenças intraespecíficas. *Posthodiplostomum* sp. 1 e *Posthodiplostomum* sp. 2, ambos do Canadá apresentaram diferenças de 3,2%. As outras sequências usadas na construção da árvore (*Posthodiplostomum cuticola*, *Posthodiplostomum* sp. 4, *Posthodiplostomum* sp. 5, *M. pricei*, *Posthodiplostomum* sp. 7 e *Posthodiplostomum* sp. 8) não se agruparam com nenhum dos isolados avaliados, sendo diferenças de 14,3-20,1% verificadas entre estas espécies. Em relação a *Ornithodiplostomum* spp., verificou-se a formação de 3 clados, um, formado pelos dois isolados de *Ornithodiplostomum* sp. 2 do Canadá, com uma diferença intraespecífica de 3,5%, outro formado por *Ornithodiplostomum* sp. 3 e *Ornithodiplostomum* sp. 4, também do Canadá, com 10,2% de diferença intraespecífica. *Ornithodiplostomum* sp. 1 não se agrupou com nenhum outro isolado.

TABELA 17- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências da região espaçadora transcrita interna (ITS) de *Posthodiplostomum nanum* obtidas no presente estudo (em negrito) e dados disponíveis no GenBank para *Posthodiplostomum* spp., *Ornithodiplostomum* spp. e *Mesoophorodiplostomum pricei*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 <i>Posthodiplostomum nanum</i> (Experimental) BR														
2 <i>Posthodiplostomum nanum</i> (Cercária) BR	0,0													
3 <i>Posthodiplostomum nanum</i> (Metacercária) BR	0,0	0,0												
4 <i>Posthodiplostomum brevicaudatum</i> (KX931440) BG	7,1	7,1	7,1											
5 <i>Posthodiplostomum centrarchi</i> (KX931441) BG	7,1	7,1	7,1	3,6										
6 <i>Posthodiplostomum</i> sp. (AB693170) JP	9,3	9,3	9,3	6,1	7,3									
7 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 3 (HM064955) CA	7,0	7,0	7,0	3,5	0,1	7,1								
8 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 5 (HM064958) CA	6,0	6,0	6,0	5,6	5,7	8,3	5,6							
9 <i>Mesoophorodiplostomum pricei</i> (HM064960) CA	6,7	6,7	6,7	3,2	1,7	7,3	1,6	5,4						
10 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 8 (HM064962) CA	6,9	6,9	6,9	3,1	1,6	6,9	1,5	5,7	0,9					
11 <i>Ornithodiplostomum scardinii</i> (KX931443) RT	7,9	7,9	7,9	4,1	4,6	7,0	4,5	7,4	4,0	3,8				
12 <i>Ornithodiplostomum</i> sp. 1 (HM064936) CA	7,8	7,8	7,8	4,2	4,2	6,9	4,1	7,0	3,5	3,5	1,0			
13 <i>Ornithodiplostomum</i> sp. 2 (HM064939) CA	7,7	7,7	7,7	4,4	4,6	7,5	4,5	7,1	4,0	3,8	0,9	1,7		
14 <i>Ornithodiplostomum</i> sp. 3 (HM064941) CA	7,7	7,7	7,7	4,4	4,6	7,5	4,5	7,1	4,0	3,8	0,9	1,7	0,0	
15 <i>Ornithodiplostomum</i> sp. 8 (HM064946) CA	8,3	8,3	8,3	4,9	5,1	7,9	5,0	7,8	4,6	4,4	1,3	2,1	1,3	1,3

TABELA 18- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene citocromo c oxidase (COI) de *Posthodiplostomum nanum* obtidas no presente estudo (em negrito) e dados disponíveis no GenBank para *Posthodiplostomum* spp., *Ornithodiplostomum* spp. e *Mesoophorodiplostomum pricei*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 <i>Posthodiplostomum nanum</i> BR																			
2 <i>P. brevicaudatum</i> (KX931419) RT	16,2																		
3 <i>P. brevicaudatum</i> (KX931420) BG	15,6	1,9																	
4 <i>P. centrarchi</i> (KX931421) BG	16,2	16,2	16,2																
5 <i>P. centrarchi</i> (KX931422) SP	16,2	16,2	16,2	0,0															
6 <i>P. centrarchi</i> (KX931423) SL	16,2	16,2	16,2	0,0	0,0														
7 <i>P. cuticola</i> (KX931424) LT	17,5	22,9	22,9	18,8	18,8	18,8													
8 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 1 (HM064795) CA	14,3	19,7	18,5	16,2	16,2	16,2	17,8												
9 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 2 (HM064798) CA	13,1	18,5	17,8	15,6	15,6	15,6	15,6	3,2											
10 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 3 (HM064807) CA	15,9	15,9	15,9	1,0	1,0	1,0	18,5	15,6	15,0										
11 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 4 (HM064844) CA	15,0	18,2	18,2	15,0	15,0	15,0	14,3	16,9	16,6	14,6									
12 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 5 (HM064858) CA	19,1	19,1	17,8	16,2	16,2	16,2	22,3	17,2	18,5	16,2	15,9								
13 <i>M. pricei</i> (HM064862) CA	14,3	15,6	15,0	17,5	17,5	17,5	21,7	16,6	16,6	17,8	18,2	19,4							
14 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 7 (HM064865) CA	15,9	18,5	17,8	18,5	18,5	18,5	19,7	17,8	18,8	18,5	18,2	18,8	15,9						
15 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 8 (HM064876) CA	20,1	19,4	18,5	16,9	16,9	16,9	19,4	16,2	16,6	16,2	17,2	19,4	17,8	17,8					
16 <i>Ornithodiplostomum</i> sp. 1 (HM064738) CA	15,3	16,2	16,2	15,0	15,0	15,0	19,7	18,5	17,8	15,0	15,3	13,4	17,2	19,1	19,4				
17 <i>Ornithodiplostomum</i> sp. 2 (KT831368) CA	11,8	14,6	13,7	16,6	16,6	16,6	18,2	17,2	16,2	16,6	14,3	18,2	14,3	15,6	18,5	13,4			
18 <i>Ornithodiplostomum</i> sp. 2 (HM064754) CA	13,1	13,7	12,7	15,0	15,0	15,0	17,8	16,6	15,6	14,3	13,1	15,9	14,0	16,9	17,8	13,4	3,5		
19 <i>Ornithodiplostomum</i> sp. 3 (HM064782) CA	14,3	15,0	14,0	16,2	16,2	16,2	18,8	17,8	16,9	15,6	15,9	17,5	13,7	16,6	17,2	13,4	7,0	6,7	
20 <i>Ornithodiplostomum</i> sp. 4 (FJ477212) CA	13,7	15,0	14,3	17,2	17,2	17,2	18,8	18,2	16,9	17,2	15,3	19,7	16,2	15,0	17,8	15,9	11,8	12,1	10,2

5.2.1.3.3- *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928)

5.2.1.3.3.1- Posição taxonômica

Filo: Platyhelminthes

Subfilo: Neodermata

Classe: Trematoda

Subclasse: Digenea

Ordem: Strigeidida

Subordem: Strigeata

Superfamília: Diplostomoidea Poirier, 1886

Família: Diplostomidae Poirier, 1886

Subfamília: Diplostominae Poirier, 1886

Gênero: *Austrodiplostomum* Szidat & Nani, 1951

Espécie: *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928)

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria straminea*.

Localidade: Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, MG (amostra previamente coletada).

5.2.1.3.3.2- Caracterização morfológica e morfométrica

Cercária: Larva do tipo distoma, longifurcada, faringeada (Figura 18). Corpo com dois pares de glândulas de penetração pré-acetabulares. Órgão anterior ovalado, apresentando pequenos espinhos. Ventosa ventral esférica, localizada na região média do corpo, apresentando coroa de pequenos espinhos em seu interior. Faringe muscular, esôfago longo que se bifurca acima das glândulas de penetração. Cecos intestinais sinuosos, passando de cada lado da ventosa ventral e terminando um pouco depois desta, antes da vesícula excretora. Tronco caudal apresentando, na sua porção proximal, 5 pares de corpos caudais. Quando em posição de repouso esta cercária permanece como corpo e cauda distendidos, estando as furcas abertas em um ângulo de aproximadamente 30° (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1973; PINTO *et al.*, 2013b). As medidas das cercárias obtidas são apresentadas na Tabela 19.

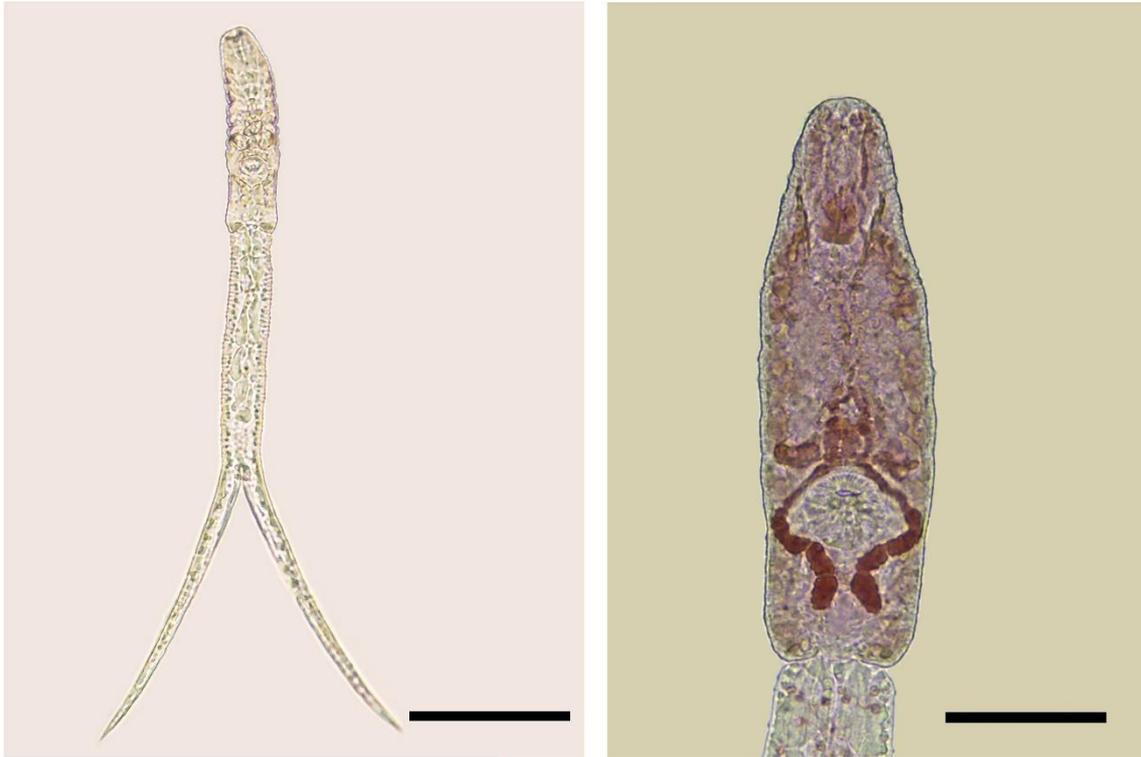


FIGURA 18- *Austrodiplostomum compactum* (a) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* naturalmente infectada coletada na Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. No canto superior direito encontra-se a larva em posição de repouso). (b) Detalhe do corpo da cercária. Escalas: 200 μ m (a), 50 μ m (b).

TABELA 19- Dados morfométricos de cercárias de *Austrodiplostomum compactum* encontradas em *Biomphalaria straminea* em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, e dados descritos para *Austrodiplostomum* spp. por outros autores. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura.

Espécies		<i>Austrodiplostomum compactum</i>	<i>Austrodiplostomum compactum</i>	<i>Austrodiplostomum compactum</i>	<i>Austrodiplostomum compactum</i>	<i>Austrodiplostomum mordax</i>
Localidade		Brasil	EUA	Brasil	Argentina	Argentina
Referência		Presente estudo	Rosser <i>et al.</i> , 2016	Pinto & Melo, 2013b	Ostrowski de Núñez, 1982	Ostrowski de Núñez, 1977
Hospedeiro		<i>Biomphalaria straminea</i>	<i>Biomphalaria havanensis</i>	<i>Biomphalaria straminea</i>	<i>Biomphalaria prona</i>	<i>Biomphalaria peregrina</i>
Corpo	Co	165 ± 13 (137-206)	187 ± 9 (169-201)	169 ± 11 (150-191)	171 ± 10 (149-190)	205 ± 9 (169-234)
	L	33 ± 3 (27-34)	40 ± 2 (34-43)	34 ± 1 (32-37)	35 ± 4 (33-41)	52 ± 2 (46-58)
Tronco caudal	Co	191 ± 14 (171-206)	179 ± 5 (171-187)	188 ± 10 (171-205)	188 ± 6 (174-199)	246 ± 15 (203-299)
	L	31 ± 4 (27-41)	29 ± 1 (25-30)	29 ± 2 (25-32)	33	35 ± 2 (29-39)
Órgão anterior	Co	23 ± 5 (14-34)	—	—	—	—
	L	18 ± 4 (14-27)	—	—	—	—
Ventosa ventral	Co	21 ± 5 (14-27)	21 ± 1 (19-24)	21 ± 1 (19-22)	24 ± 3 (21-31)	27 ± 2 (23-30)
	L	21 ± 6 (14-27)	21 ± 2 (19-24)	22 ± 2 (19-26)	25 ± 4 (21-31)	29 ± 2 (23-34)
Furcas	Co	197 ± 9 (178-213)	198 ± 5 (187-206)	191 ± 9 (170-205)	187 ± 12 (166-207)	246 ± 11 (203-273)
	L	15 ± 3 (14-21)	15 ± 1 (13-24)	14 ± 2 (10-18)	—	24 ± 3 (17-26)

5.2.1.3.3.3- Estudos moleculares

As sequências parciais do gene 18S obtidas para *A. compactum* no presente estudo foram idênticas às sequências de isolados desta espécie obtidos nos EUA (Tabela 11). As análises filogenéticas demonstraram o agrupamento de *Austrodiplostomum* spp. num clado distinto dos outros gêneros considerados. Além disso, uma sequência identificada como Diplostomidae sp. nos EUA agrupou em clado próximo ao de *A. compactum*, diferindo em apenas 0,3%, sendo possível que sejam parasitos do mesmo gênero. As diferenças moleculares verificadas entre os outros gêneros considerados nas análises foram de 2,1% para *Hysteromorpha*, 0,9-1,5% para *Posthodiplostomum* spp., 2,4-2,7% para *Diplostomum* e 1,2% em relação a *Ornithodiplostomum* spp.

As sequências ITS obtidas também apresentaram 100% de similaridade em relação aos isolados de *A. compactum* dos EUA (Tabela 20). As análises filogenéticas (figura 14) também demonstraram a presença de um clado distinto em relação aos outros gêneros considerados nas análises. *Tylodelphys* é o gênero com maior proximidade filogenética, apresentando 4,9 a 7,0% de diferença molecular em relação a *A. compactum*. A diferença entre as três espécies *Tylodelphys* consideradas nas análises foi entre 0,3 e 5,5%. Além disso, as espécies deste último gênero estão presentes em dois cladros distintos.

As sequências COI obtidas para *A. compactum* no presente estudo diferiram entre 0,3% e 1,1% em relação a isolados desta espécie obtidos nos EUA, México, Brasil e Peru (Tabela 21). Todos estes isolados agruparam-se em um mesmo clado com significativo suporte (Figura 15). Outros dois isolados identificados como *Austrodiplostomum* sp. 2 nos EUA agruparam em um subclado distinto, sendo diferenças de 9,7-10% verificadas em relação a *A. compactum*. Um outro isolado identificado como *Austrodiplostomum* sp. nos EUA agrupou separadamente dos outros dois subclados, diferindo entre 8,5 e 10,0% em relação a *A. compactum* e *Austrodiplostomum* sp. 2. As diferenças moleculares obtidas e a topologia da árvore filogenética obtida sugerem a presença de três espécies de *Austrodiplostomum* no continente americano. Em relação ao gênero *Tylodelphys*, duas das espécies (*Tylodelphys* sp. da Nova Zelândia e *Tylodelphys sheuringi* do Canadá) agruparam-se em um clado próximo ao de *Austrodiplostomum* spp., as outras sequências de *Tylodelphys* spp. apresentaram-se como politomias na base da árvore. A diferença molecular entre *Austrodiplostomum* spp. e *Tylodelphys* spp. foi de 11,1% e 16,2%.

TABELA 20- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências da região espaçadora transcrita interna (ITS) de *Austrodiplostomum compactum* obtidas no presente estudo (em negrito) e dados disponíveis no GenBank para outros isolados de *A. compactum* e para *Tylodelphys* spp.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>Austrodiplostomum compactum</i> (Cercária) BR								
2 <i>Austrodiplostomum compactum</i> (Metacercária) BR	0,0							
3 <i>Austrodiplostomum compactum</i> (KT728782) EUA	0,0	0,0						
4 <i>Austrodiplostomum compactum</i> (KT728776) EUA	0,0	0,0	0,0					
5 <i>Austrodiplostomum compactum</i> (KT728780) EUA	0,0	0,0	0,0	0,0				
6 <i>Austrodiplostomum compactum</i> (KT728766) EUA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
7 <i>Tylodelphys clavata</i> (JQ665459) AL	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0		
8 <i>Tylodelphys scheuringi</i> (FJ469596) CA	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,4	
9 <i>Tylodelphys immer</i> (KT186804) CA	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	4,9	5,5	0,3

TABELA 21- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI) de *Austrodiplostomum compactum* obtidas no presente estudo (em negrito) e e dados disponíveis no GenBank para *Austrodiplostomum* spp. e para *Tylodelphys* spp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1 <i>Austrodiplostomum compactum</i> (Cerc.) BR																				
2 <i>Austrodiplostomum compactum</i> (Met.) BR	0,3																			
3 <i>A. compactum</i> (KR271025) EUA	0,6	0,9																		
4 <i>A. compactum</i> (KM115934) MX	0,9	1,1	0,3																	
5 <i>A. compactum</i> (KM115964) MX	0,3	0,6	0,3	0,6																
6 <i>A. compactum</i> (KR271027) PE	0,9	1,1	0,3	0,6	0,6															
7 <i>A. compactum</i> (KR271025) BR	0,6	0,9	0,0	0,3	0,3	0,3														
8 <i>A. compactum</i> (KR271028) EUA	0,9	1,1	0,3	0,6	0,6	0,6	0,3													
9 <i>A. compactum</i> (KT728788) EUA	0,6	0,9	0,6	0,9	0,3	0,9	0,6	0,3												
10 <i>A. compactum</i> (KT728799) EUA	0,6	0,9	0,0	0,3	0,3	0,3	0,0	0,3	0,6											
11 <i>Austrodiplostomum</i> sp. (KR271029) EUA	8,5	8,8	9,1	9,4	8,8	8,8	9,1	9,4	9,1	9,1										
12 <i>Austrodiplostomum</i> sp. 2 (KU707940) EUA	10,0	10,3	10,0	10,3	9,7	9,7	10,0	10,3	10,0	10,0	10,0									
13 <i>Austrodiplostomum</i> sp. 2 (KU707945) EUA	10,0	10,3	10,0	10,3	9,7	9,7	10,0	10,3	10,0	10,0	10,0	0,0								
14 <i>Tylodelphys clavata</i> (JX986909) AL	15,1	15,4	15,4	15,7	15,4	15,1	15,4	15,1	15,1	15,4	14,5	16,2	16,2							
15 <i>Tylodelphys excavata</i> (KC685344) RT	11,4	11,7	11,7	12,0	11,7	12,0	11,7	12,0	12,0	11,7	13,4	14,2	14,2	10,5						
16 <i>Tylodelphys mashonensis</i> (KC685328) TZ	14,0	14,2	14,2	14,5	14,2	14,0	14,2	14,0	14,0	14,2	14,0	14,5	14,5	12,5	11,7					
17 <i>Tylodelphys scheuringi</i> (HM064912) CA	12,8	13,1	13,1	13,4	13,1	13,4	13,1	12,8	12,8	13,1	13,4	14,5	14,5	13,7	12,3	12,0				
18 <i>Tylodelphys</i> sp. (KU588149) NZ	11,1	11,4	11,4	11,7	11,4	11,1	11,4	11,1	11,1	11,4	12,3	12,8	12,8	12,0	9,7	11,1	8,3			
19 <i>Tylodelphys</i> sp. 1 (KC685352) TZ	14,2	14,5	14,2	14,5	14,5	14,5	14,2	14,0	14,2	14,2	13,1	15,4	15,4	10,5	10,3	13,1	14,0	13,7		
20 <i>Tylodelphys</i> sp. 2 (KC685358) TZ	12,8	13,1	13,1	13,4	13,1	12,8	13,1	13,4	13,4	13,1	13,7	15,4	15,4	13,4	11,1	12,0	12,8	12,5	12,0	

5.2.2- Família Strigeidae

5.2.2.1-Aspectos gerais

Três espécies de representantes da família Strigeidae foram identificadas entre as amostras de cercárias obtidas em moluscos de Belo Horizonte no presente estudo. Entre as 7 amostras previamente coletadas na represa da Pampulha, uma continha uma espécie pertencente a esta família. Além disso, 2 novas amostras pertencentes a duas espécies que não haviam sido previamente coletadas, foram obtidas em *Biomphalaria straminea* da Lagoa da Cidade Administrativa. Estas cercárias obtidas durante as novas amostragens realizadas foram utilizadas em estudos experimentais, contudo não houve sucesso na obtenção de outros estágios evolutivos.

5.2.2.2- Dados moleculares gerais

Sequências nucleotídicas das regiões 18S, ITS e COI avaliadas no presente estudo foram obtidas para todas as espécies de cercárias de Strigeidae avaliadas. Estas sequências foram comparadas com outras depositadas no GenBank, sendo o número de acesso, hospedeiro, estágio evolutivo e localidade de origem destes isolados considerados para comparação, apresentados na Tabela 22.

Bandas com aproximadamente 600 pb foram obtidas através da amplificação e sequenciamento da região parcial do gene 18S. Sequências de boa qualidade foram obtidas em ambas as direções para todas as amostras já na primeira análise. Após edição destas sequências, fragmentos entre 562-579 pb foram considerados para as análises. Duas amostras de metacercárias previamente coletadas não amplificaram essa região (possivelmente devido à degradação de DNA), enquanto em uma outra, verificou-se a amplificação de DNA do hospedeiro (*Poecilia reticulata*). As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas entre si e com outras 13 sequências depositadas no GenBank (Tabela 22). O alinhamento final, após edição das extremidades, resultou na análise de 500 pb. A árvore filogenética obtida (Figura 19) revelou que duas das três espécies de Strigeidae avaliadas agruparam-se com representantes de gêneros com sequências disponíveis no GenBank.

Para a região ITS, das 8 amostras avaliadas, sequências de boa qualidade foram

obtidas já na primeira análise para 6 amostras. Para as duas outras amostras não foram verificadas a presença de bandas no gel de agarose após eletroforese dos produtos de PCR. Bandas de aproximadamente 1100 pb foram obtidas após PCR direcionada para esta região. As sequências obtidas em ambas as direções para estas amostras apresentaram, após edição, fragmentos entre 1013 pb e 1278 pb. As 6 sequências obtidas com sucesso foram comparadas entre si e com outras 13 sequências disponíveis no GenBank (Tabela 22). Após edição das extremidades dos alinhamentos de 1057 pb foram considerados para a análise. A topologia das árvores obtidas por IB e MV (Figura 20) apresentaram topologia semelhante, sendo verificado que duas das espécies identificadas agruparam em dois clados diferentes (com elevado suporte) juntamente com representantes dos mesmos gêneros com sequências disponíveis no GenBank. A terceira espécie agrupou-se em um clado distinto das outras espécies de Strigeidae com sequências disponíveis na base de dados.

Como verificado com os Diplostomidae, o uso dos primers Dice1-F e Dice 11R nas amostras de Strigeidae revelou os mesmos problemas relacionados a presença das caudas Poli-T e Poli-A. Contudo, nestas amostras foi possível a geração de contigs ou a edição de fragmentos com tamanho significativo e boa qualidade, especialmente considerando-se as sequências no obtidas no sentido “*Reverse*”. Após edição, foram obtidos fragmentos entre 463 pb e 662 pb. Foram obtidas as sequências das espécies cogenéricas e os gêneros mais próximos verificados para as espécies avaliadas no presente estudo são também apresentadas na Tabela 22. A região considerada para as análises após alinhamento apresentou 386 pb. Não foi verificada similaridade significativa entre as sequências do presente estudos e dados disponíveis no GenBank e Boldsistem para representantes desta família.

TABELA 22- Dados das sequências dos genes 18S, ITS e COI de trematódeos da família Strigeidae disponíveis no GenBank utilizadas na construção das árvores filogenéticas. Informações sobre as sequências de espécies de Diplostomidae utilizadas como *outgroup* nas análises filogenéticas são também apresentadas. Abreviaturas: C= cercária, M= metacercária, A= adulto.

Espécies	Hospedeiros	Estágio evolutivo	Localidade	Número de acesso no GenBank		
				COI	18S	ITS
<i>Apharyngostrigea cornu</i>	<i>Ardea herodias; Nyctanassa violacea</i>	A	Canadá; EUA	JF769450	AY245756	JX977840
<i>Apharyngostrigea pipientis</i>	<i>Lithobates pipiens</i>	M	Canadá; México	HM064886	AY245757	HM064966
<i>Apatemon</i> sp.	<i>Stagnicola elodes</i>	C	Canadá	KT831359		
<i>Australapatemon burti</i>	<i>Oxyura jamaicensis; Anas diazi</i>	A	México		MF398360	JX977788
<i>Australapatemon niewiadomski</i>	<i>Oxyura jamaicensis</i>	A	Nova Zelândia			KT334175
<i>Australapatemon mclaughlini</i>	<i>Physella gyrina</i>	C	Canadá			KY207628
<i>Australapatemon</i> sp.	<i>Oxyura jamaicensis</i>	A	Canadá		MF124267	KY570946
<i>Bolbophorus levantinus</i>	<i>Nycticorax nycticorax</i>	A	EUA		AF490576	
<i>Cotylurus</i> aff. <i>gallinulae</i>	<i>Stagnicola elodes</i>	C	Canadá	KT831347		
<i>Cotylurus cornutus</i>	<i>Gyraulus acronicus</i>	M	Noruega	KY513236		
<i>Cotylurus gallinulae</i>	<i>Aythya affinis</i>	A	México	JX977781		JX977841
<i>Diplostomoidea</i> sp.	<i>Leptoxis carinata</i>	C	EUA		JX467577	
<i>Ichthyocotylurus erraticus</i>	<i>Coregonus autumnalis</i>	M	Reino Unido		AJ287526	
<i>Ichthyocotylurus pileatus</i>	<i>Perca flavescens</i>	M	Canadá	HM064724		
<i>Ichthyocotylurus</i> sp.3	<i>Notropis hudsonius</i>	M	Canadá	HM064730		
<i>Parastrigea diovadena</i>	<i>Eudocimus albus</i>	A	México		MF398365	JX977808
<i>Parastrigea platelae</i>	<i>Platalea ajaja</i>	A	México		MF398364	
Strigeidae sp.	<i>Turdus naumanni</i>	A	Japão		LC011454	

TABELA 22-Continuação...

Strigeidae sp.	<i>Egretta garzetta</i>	A	Israel	AY245711	AY245711
Strigeidae sp. 9	<i>Lepomis gibbosus</i>	M	Canadá		HM064972
Strigeidae sp. 10	<i>Etheostoma nigrum</i>	M	Canadá		HM064965
Strigeidae sp.8	<i>Etheostoma nigrum</i>	M	Canadá		HM064970
<i>Uvulifer</i> sp.	<i>Megaceryle alcyon</i>	A	México	MF398355	
<i>Tylodelphys azteca</i>	<i>Podilymbus podiceps</i>	A	México	MF398358	KT175388
<i>Tylodelphys mashonensis</i>	<i>Bulinus</i> sp.	C	Tanzânia	KR863376	

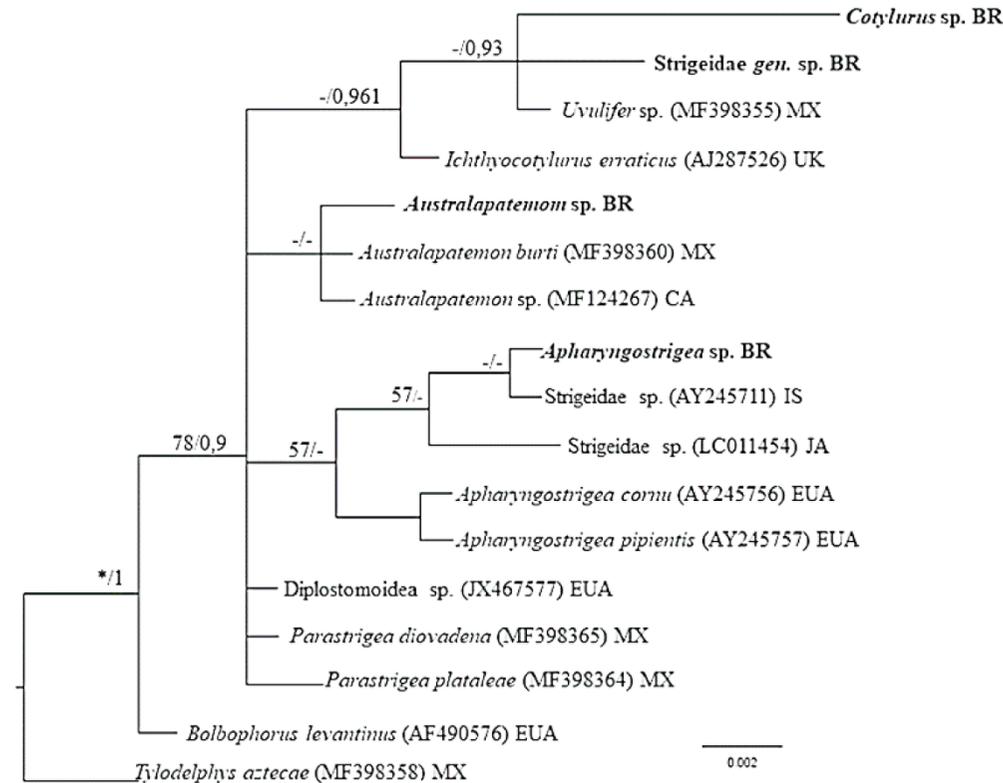


FIGURA 19- Árvore filogenética inferida por Inferência Bayesiana (IB) a partir de sequências do gene 18S rRNA de amostras da família Strigeidae obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank. O suporte dos nós é fornecido pelos valores de bootstrap obtido por Máxima Verossimilhança (MV) e probabilidade posterior obtidos por IB (MV/IB). Valores <0,95 e <50 são representados como -. Valores não obtidos por MV são representados por *

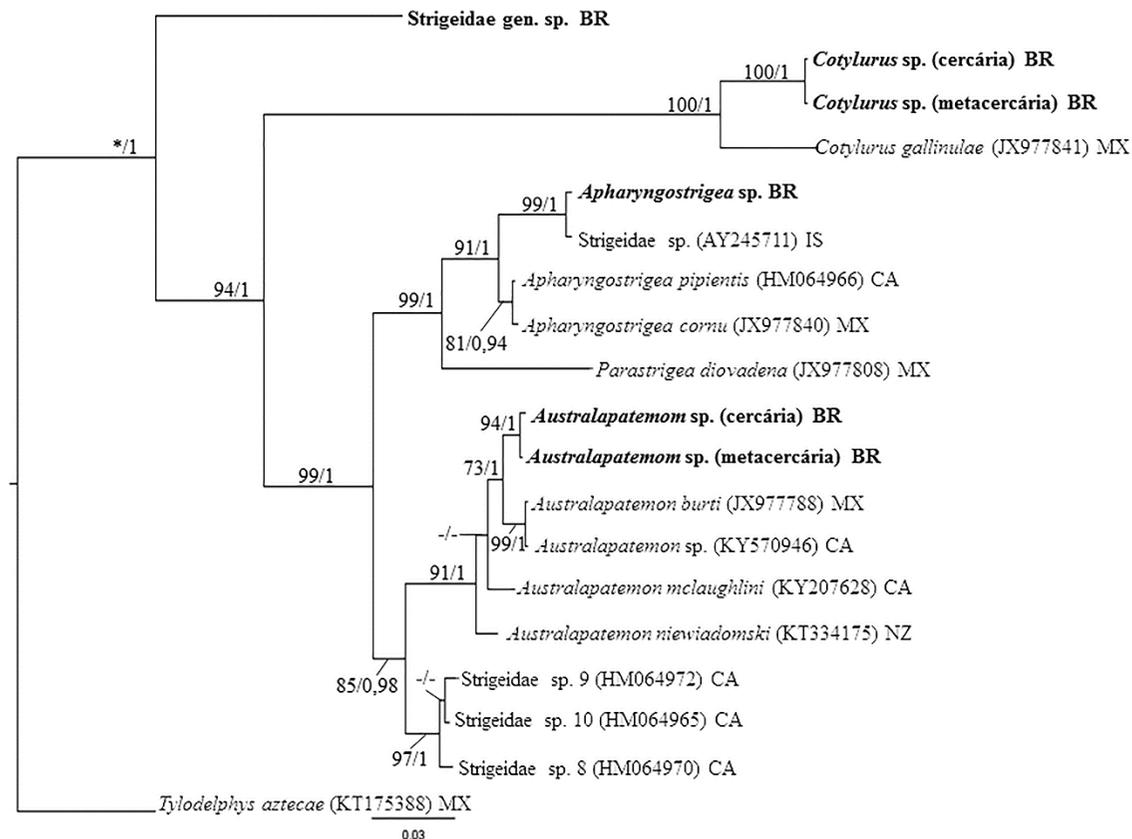


FIGURA 20- Árvore filogenética inferida por Inferência Bayesiana (BI) a partir de sequências da região transcrita espaçadora interna (ITS) de amostras da família Strigeidae obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank. O suporte dos nós é fornecido pelos valores de *bootstrap* obtido por Máxima Verossimilhança (MV) e probabilidade posterior obtidos por IB (MV/IB). Valores <50 e <0,95 são representados como -. Valores não obtidos por MV são representados por *.

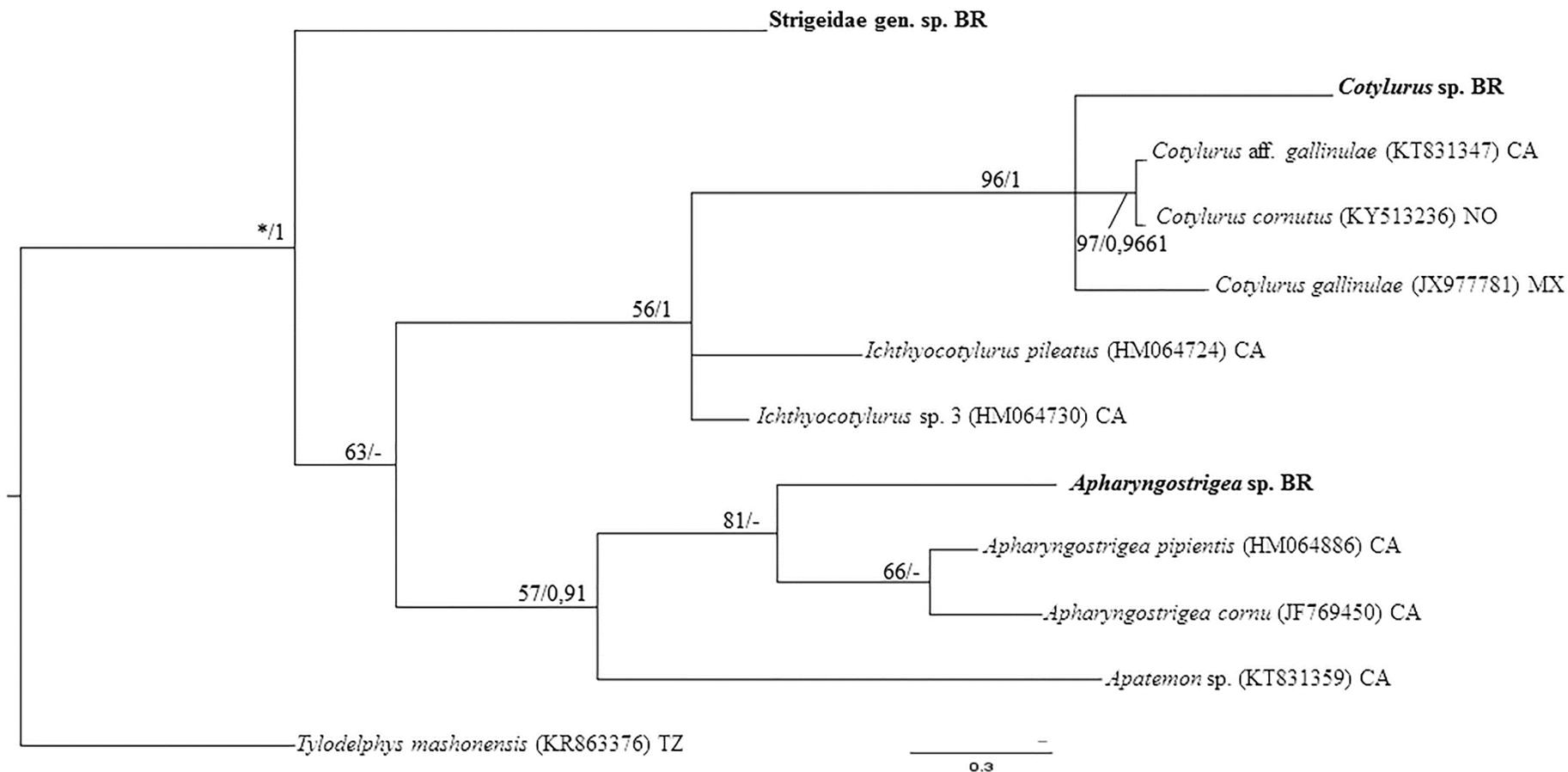


FIGURA 21- Árvore filogenética inferida por Inferência Bayesiana (IB) a partir de sequências do citocromo c oxidase subunidade I (COI) das amostras da família Strigeidae obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank. O suporte dos nós é fornecido pelos valores de bootstrap obtido por Máxima Verossimilhança (MV) e probabilidade posterior obtidos por IB (MV/IB). Valores <50 e <0,95 são representados como -. Valores não obtidos por MV são representados por *.

5.2.2.3- Caracterização das espécies encontradas

5.2.2.3.1- *Cotylurus* sp.

5.2.2.3.1.1- Posição taxonômica

Filo: Platyhelminthes

Subfilo: Neodermata

Classe: Trematoda

Subclasse: Digenea

Ordem: Strigeidida

Subordem: Strigeata

Superfamília: Diplostomoidea Poirier, 1886

Família: Strigeidae Railliet, 1919

Subfamília: Strigeinae Railliet, 1919

Gênero: *Cotylurus* Szidat, 1928

Espécie: *Cotylurus* sp.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria straminea*

Localidade: Lagoa da Cidade Administrativa

5.2.2.3.1.2- Caracterização morfológica e morfométrica

Cercária: Larva do tipo distoma, longifurcada, faringeada (Figura 22a e 22b). Corpo alongado, extremidade anterior arredondada com espinhos e a posterior levemente truncada. Órgão anterior subterminal, mais longo que largo. Faringe muscular, ligeiramente alongada. Esôfago presente. Cecos intestinais longos, passando ao lado da ventosa ventral e se estendendo até aproximadamente o final desta. Acima da ventosa ventral se encontra um par de ocelos não pigmentados. As glândulas de penetração estão localizadas na metade posterior do corpo. Tronco caudal curto. Furcas longas, maiores que o tronco caudal. As medidas das cercárias de *Cotylurus* sp. avaliadas no presente estudo são apresentadas na Tabela 23.

Metacercárias do tipo *Tetracotyle* (Figura 22c), semelhantes às descritas para espécies do gênero *Cotylurus*, foram encontradas em exemplares de *B. straminea* coletados na mesma coleção aquática onde foram encontrados moluscos albergando cercárias.

5.2.2.3.1.3- Estudos experimentais

Exemplares de *Biomphalaria glabrata* criados em laboratório foram expostos a infecção por cercárias de *Cotylurus* sp., entretanto, não foi verificada a formação de metacercárias nestes hospedeiros.

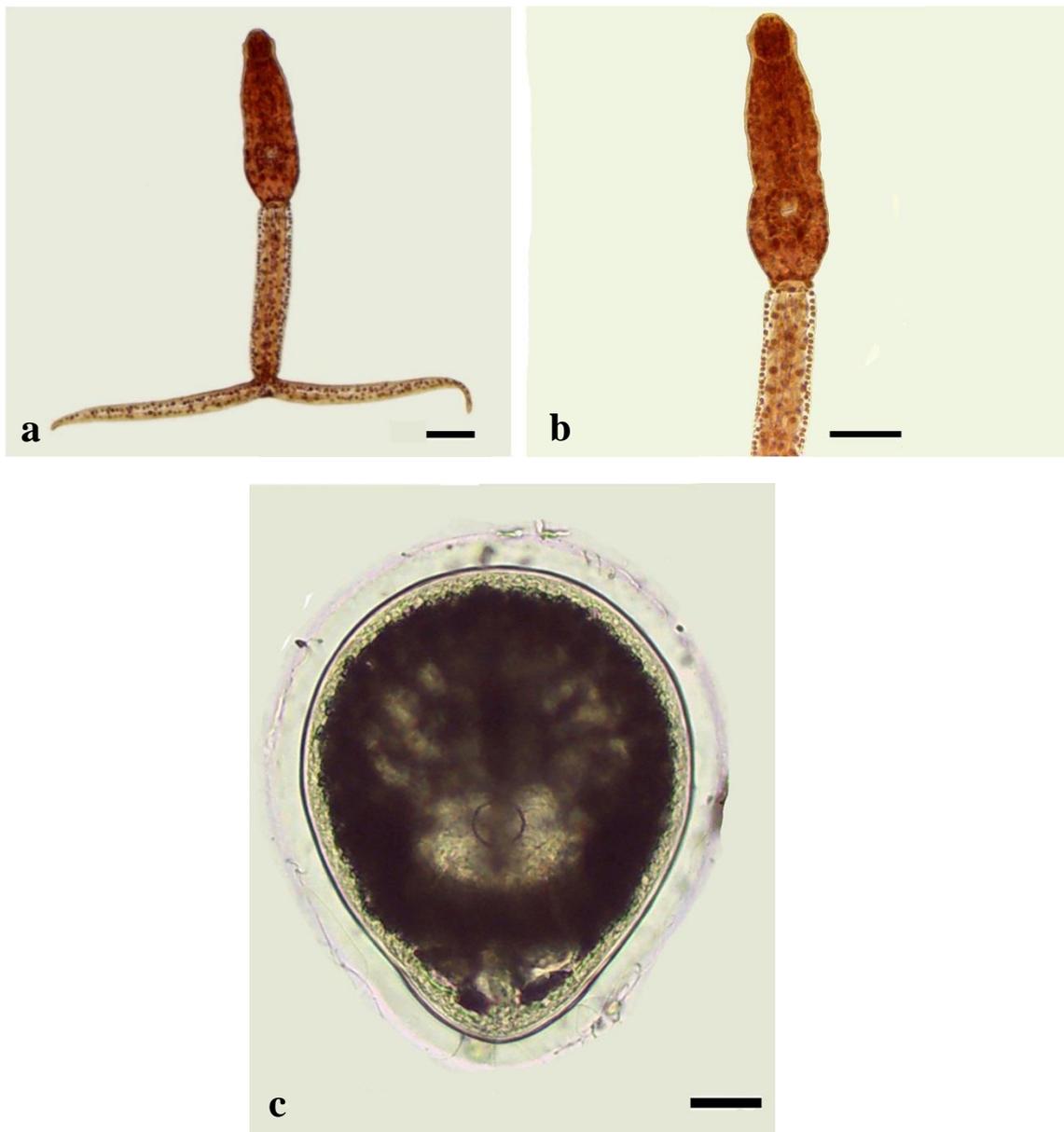


FIGURA 22- *Cotylurus* sp. (a) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada na Lagoa da Cidade Administrativa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. (b) Detalhe do corpo da cercária. (c) Metacercária encontrada em *Biomphalaria straminea* naturalmente infectada. Escalas: 50 μ m.

TABELA 23- Dados morfométricos de cercárias de *Cotylurus* sp. encontradas em *Biomphalaria straminea* em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, e dados relatados para larvas semelhantes por outros autores na América do Sul. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura.

Espécies		<i>Cotylurus</i> sp.	<i>Cotylurus lutzii</i>	<i>Cercaria caratinguensis</i>	<i>Cercaria caratinguensis</i>	<i>Furcocercaria</i> sp. II	<i>Cercaria ghaziaporzanae</i>	<i>Furcocercaria</i> N°3
Localidade		Brasil	Brasil	Brasil	Brasil	Argentina	Venezuela	Uruguai
Referência		Presente estudo	Basch, 1969	Ruiz, 1953	Moraes <i>et al</i> , 2009	Ostrowski de Núñez, 1972	Nasir, 1979	Martonelli <i>et al.</i> , 2013
Hospedeiro		<i>B. straminea</i>	<i>B. glabrata</i>	<i>B. glabrata</i>	<i>B. tenagophila</i>	<i>A. concentricus</i>	<i>Gundlachia</i> sp.	<i>B. tenagophila</i>
Corpo	Co	172 ± 7 (158-185)	151 (130-174)	129-172	120-130	143-156	187-242	193 ± 37 (150-240)
	L	48 ± 7 (34-62)	34 (31-49)	61-70	45-55	39	88-132	80 ± 10 (70-90)
Tronco caudal	Co	193 ± 16 (165-247)	156 (115-166)	148-172	140-145	234-260	220-308	158 ± 8 (150-170)
	L	41 ± 4 (34-48)	32 (29-39)	37-43	—	26	55-66	210 ± 22 (190-240)
Órgão anterior	Co	32 ± 6 (21-41)	31 (26-34)	25-40	25-35	—	48-68	50 ± 8 (40-59)
	L	24 ± 5 (14-34)	23 (21-26)	25-38	—	—	40-50	32 ± 2 (30-35)
Ventosa ventral	Co	32 ± 7 (21-43)	30 (22-31)	25-31	29-30	25-28	—	37 ± 2 (35-40)
	L	30 ± 6 (21-43)	—	—	—	—	—	37 ± 2 (35-40)
Furcas	Co	213 ± 8 (185-226)	160 (143-174)	166-191	150-195	195-247	—	—
	L	15 ± 3 (14-21)	15 (13-15.6)	12	—	13	—	—

5.2.2.3.1.4- Estudos moleculares

As sequências obtidas para o gene 18S revelaram a proximidade de *Cotylurus* sp. com Strigeidae gen. sp. (item 5.2.2.3.2) do presente estudo e *Uvulifer* sp. do México (Figura 19), sendo a diferença molecular entre eles de 1,8% e 1,3% respectivamente. Agrupado em um subclado encontra-se *Ichthyocotylurus erraticus* do Reino Unido, sendo verificada uma diferença de 1,8% em relação a *Cotylurus* sp. Além disso, as sequências de *Cotylurus* sp. diferem significativamente de *Apharyngostrigea* spp. (1,8-2,4%), *Australapatemon* spp. (2,2%), *Parastrigea* spp. (2,0-2,2%), *Bolbophorus levantinus* (2,2%) e Diplostomoidea sp. (2,0%). Uma larva semelhante a *Cotylurus* sp. previamente nomeada como Strigeidae, foram identificadas como pertencentes ao gênero *Australapatemon* sp. As sequências obtidas com o marcador 18S agruparam esta espécie com os isolados de *Australapatemon burti* do México e *Australapatemon* sp. do Canadá, com 0,2% de diferença. *Bolbophorus levantinus* dos Estados Unidos demonstrou uma diferença (em relação a *Australapatemon*) de 0,7%. Além disso, as sequências de Diplostomoidea sp. dos Estados Unidos, *Parastrigea diovadena* e *Parastrigea platelae* do México, que apresentaram uma alta similaridade em relação as sequências do presente estudo quando foram comparadas no BLAST, não agruparam com nenhum dos nossos isolados apesar de apresentar diferenças entre 0,4 e 0,7% respectivamente.

Os resultados obtidos através da análise de sequências ITS possibilitaram a identificação de *Cotylurus* sp. Esta amostra agrupou-se em mesmo clado com *Cotylurus gallinulae* do México (Figura 20), sendo verificada entre estas amostras uma diferença interespecífica de 5,1% (Tabela 25). Diferenças significativas entre *Cotylurus* sp. e os outros gêneros considerados nas análises foram também encontradas (3,3-3,1% em relação a *Apharyngostrigea* spp., 15,4-16,1% de *Australapatemon* spp. e 12,2% de *Parastrigea diovadena*). Os isolados de *Australapatemon* sp. (cercária e metacercária) obtidos com o marcador ITS, agruparam no mesmo clado, sem apresentar diferenças entre elas. *Australapatemon burti* do México e *Australapatemon* sp. do Canadá formaram juntos um clado, inexistindo diferença entre as sequências. As outras duas sequências do gênero *Australapatemon* disponíveis no GenBank, foram *A. mclaughlini* e *A. niewiandoski*, cada uma delas com uma diferença de 1,8% e 1,9% em relação *Australapatemon* sp. obtidos neste trabalho, respectivamente. As sequências das três

espécies indeterminadas (*Strigeidae* sp. 8, *Strigeidae* sp. 9 e *Strigeidae* sp. 10) oriundas do Canadá não agruparam com nenhum dos isolados deste estudo. Contudo *Strigeidae* sp. 9 e *Strigeidae* sp. 10 se agruparam com uma diferença de 0,5%.

As análises realizadas com as sequências COI demonstraram o agrupamento de *Cotylurus* sp. em um mesmo clado contendo 2 espécies do gênero com sequências disponíveis (Figura 21). A diferença molecular entre *Cotylurus* sp. e as espécies cogenêricas foi de 11,0-12,5%. Uma espécie identificada como *Cotylurus* aff. *gallinulae* no Canadá agrupou com *C. cornutus* da Noruega, com uma diferença de 1,9%, sugerindo que são isolados coespecíficos. Considerando-se os outros gêneros da família *Strigeidae* avaliados, foram observadas diferenças significativas em relação a *Apatemon* sp. (21,0%), a *Apharyngostrigea* spp. (16,6-19,7%) e *Ichthyocotylurus* spp. (15,0-16,0%) (Tabela 26).

TABELA 24- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene 18S rRNA obtidas para três espécies de trematódeos da família Strigeidae obtidas no presente trabalho (em negrito) e sequências disponíveis no GenBank para espécies relacionadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>Apharyngostrigea</i> (Cercária) BR															
2 <i>Apharyngostrigea cornu</i> (AY245756) EUA	0,7														
3 <i>Apharyngostrigea pipientis</i> (AY245757) EUA	0,7	0,0													
4 <i>Australapatemon</i> (Cercária) BR	1,1	0,9	0,9												
5 <i>Australapatemon burti</i> (MF398360) MX	0,9	0,7	0,7	0,2											
6 <i>Australapatemon</i> sp. (MF124267) CA	0,9	0,7	0,7	0,2	0,0										
7 <i>Bolbophorus levantinus</i> (AF490576) EUA	0,7	0,9	0,9	0,9	0,7	0,7									
8 <i>Cotylurus</i> (Cercária) BR	1,8	2,4	2,4	2,0	2,2	2,2	2,0								
9 Strigeidae gen. sp. (Cercária) BR	1,5	1,3	1,3	1,5	1,5	1,5	1,8	1,8							
10 <i>Diplostomoidea</i> sp. (JX467577) EUA	0,7	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,4	2,0	1,3						
11 <i>Ichthyocotylurus erraticus</i> (AJ287526) RU	1,3	0,7	0,7	0,7	0,9	0,9	1,1	1,8	0,9	0,7					
12 <i>Parastrigea diovadena</i> (MF398365) MX	0,7	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,4	2,0	1,3	0,0	0,7				
13 <i>Parastrigea plataleae</i> (MF398364) MX	0,9	0,7	0,7	0,7	0,4	0,4	0,7	2,2	1,5	0,2	0,9	0,2			
14 Strigeidae sp. (AY245711) IS	0,0	0,7	0,7	1,1	0,9	0,9	0,7	1,8	1,5	0,7	1,3	0,7	0,9		
15 Strigeidae sp. (LC011454) JÁ	0,7	0,9	0,9	1,3	1,1	1,1	0,9	2,0	1,8	0,9	1,1	0,9	1,1	0,7	
16 <i>Uvulifer</i> sp. (MF398355) MX	1,3	1,1	1,1	1,1	1,3	1,3	1,5	1,3	0,4	1,1	0,4	1,1	1,3	1,3	1,5

TABELA 25- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências da região espaçadora transcrita interna (ITS) de espécies de Strigeidae obtidas no presente estudo (em negrito) e dados disponíveis no GenBank para espécies relacionadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 <i>Apharyngostrigea</i> sp. (Cercária) BR																	
2 <i>Apharyngostrigea cornu</i> (JX977840) MX	3,3																
3 <i>Apharyngostrigea pipientis</i> (HM064966) CA	3,1	0,1															
4 <i>Australapatemom</i> sp. (Cercária) BR	8,7	6,8	7,0														
5 <i>Australapatemom</i> sp. (Metacercária) BR	8,7	6,8	7,0	0,0													
6 <i>Australapatemom burti</i> (JX977788) MX	9,0	7,1	7,2	1,4	1,4												
7 <i>Australapatemom mclaughlini</i> (KY207628) CA	8,6	7,0	7,1	1,8	1,8	2,0											
8 <i>Australapatemom niewiadomski</i> (KT334175) NZ	8,5	7,0	7,1	1,9	1,9	1,9	1,6										
9 <i>Australapatemon</i> sp. (KY570946) CA	9,0	7,1	7,2	1,4	1,4	0,0	2,0	1,9									
10 <i>Cotylurus</i> sp. (Cercária) BR	17,6	15,6	15,6	15,4	15,4	16,1	16,0	15,3	16,1								
11 <i>Cotylurus</i> sp. (Metacercária) BR	17,6	15,6	15,6	15,4	15,4	16,1	16,0	15,3	16,1	0,0							
12 <i>Cotylurus gallinulae</i> (JX977841) MX	19,3	17,8	17,8	17,1	17,1	17,9	17,8	17,1	17,9	5,1	5,1						
13 Strigeidae gen. sp. (Cercária) BR	16,3	14,6	14,6	13,1	13,1	13,7	12,8	13,4	13,7	17,8	17,8	19,9					
14 Strigeidae sp. (AY245711) IS	0,3	3,3	3,1	8,7	8,7	9,0	8,6	8,5	9,0	17,6	17,6	19,3	16,3				
15 Strigeidae sp. 8 (HM064970) CA	8,1	6,1	6,3	4,5	4,5	4,6	3,7	4,1	4,6	14,2	14,2	16,5	12,7	8,1			
16 Strigeidae sp. 9 (HM064972) CA	7,7	5,7	5,9	4,2	4,2	4,4	3,7	3,8	4,4	14,3	14,3	16,7	13,3	7,7	1,0		
17 Strigeidae sp. 10 (HM064965) CA	7,4	5,5	5,6	4,4	4,4	4,5	3,6	4,0	4,5	14,1	14,1	16,4	12,7	7,4	0,7	0,5	
18 <i>Parastrigea diovadena</i> (JX977808) MX	7,4	6,7	6,6	8,9	8,9	9,3	9,0	9,0	9,3	17,2	17,2	18,9	16,3	7,1	7,9	7,8	7,5

TABELA 26- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene citocromo c oxidase subunidade I (COI) de espécies de Strigeidae obtidas no presente estudo (em negrito) e dados disponíveis no GenBank para espécies relacionadas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>Apatemon</i> sp. (KT831359) CA										
2 <i>Apharyngostrigea</i> sp. BR	15,0									
3 <i>Apharyngostrigea cornu</i> (JF769450) CA	16,9	11,3								
4 <i>Apharyngostrigea pipientis</i> (HM064886) CA	16,3	12,2	6,9							
5 <i>Cotylurus</i> sp. BR	21,0	19,7	16,6	16,9						
6 <i>Cotylurus</i> aff. <i>gallinulae</i> (KT831347) CA	18,2	21,6	19,1	18,2	12,5					
7 <i>Cotylurus gallinulae</i> (JX977781) MX	17,9	18,8	16,0	17,2	11,0	9,4				
8 <i>Cotylurus cornutus</i> (KY513236) NO	18,2	21,3	18,2	17,6	12,2	1,9	8,8			
9 Strigeidae gen. sp. (Cercária) BR	19,4	19,1	16,9	17,2	16,3	19,1	17,6	18,8		
10 <i>Ichthyocotylurus pileatus</i> (KR863376) CA	17,2	17,6	17,6	16,3	16,0	16,0	14,4	16,3	15,0	
11 <i>Ichthyocotylurus</i> sp.3 (HM064730) CA	16,9	16,0	15,7	14,7	15,0	14,4	14,1	15,0	16,0	10,3

5.2.2.3.2- Strigeidae gen. sp.

5.2.2.3.2.1- Posição taxonômica

Filo: Platyhelminthes

Subfilo: Neodermata

Classe: Trematoda

Subclasse: Digenea

Ordem: Strigeidida

Subordem: Strigeata

Superfamília: Diplostomoidea Poirier, 1886

Família: Strigeidae Railliet, 1919

Espécie: Strigeidae gen. sp.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria straminea*

Localidade: Lagoa da Cidade Administrativa

5.2.2.3.2.2- Caracterização morfológica e morfométrica

Cercária: Larva do tipo monostoma, faringeada, longifurcada (Figura 23). Corpo alongado, quase da mesma largura que o tronco caudal. Furcas longas, maior ou igual ao comprimento do tronco caudal. Órgão anterior subterminal. Faringe muscular, esôfago ligeiramente longo. Cecos intestinais até quase a região posterior do corpo. Ventosa ventral ausente. Tronco caudal sem corpos caudais. Quando em posição de repouso, a larva permanece com o corpo curvado ventralmente. As medidas das cercárias de Strigeidae gen. sp. obtidas no presente estudo são apresentadas na Tabela 27 e comparadas com larvas semelhantes descritas no Uruguai.

5.2.2.3.2.3- Estudos experimentais

Tentativas de infecção experimental de *P. reticulata* e *B. glabrata* por cercárias de Strigeidae gen. sp. foram realizadas visando a obtenção de metacercárias, entretanto não se verificou o encistamento desta cercária em nenhum destes hospedeiros.

5.2.2.3.2.4- Estudos moleculares

As sequências 18S obtidas para Strigeidae gen. sp. no presente estudo diferem das espécies consideradas nas análises moleculares, incluindo *Cotylurus* sp. (1,8%), *Apharyngostrigea* spp. (1,3-1,5%), *Australapatemon* spp. (1,5%), *Parastrigea* spp. (2,0-2,8%), Diplostomidae spp. (2,0%), *Uvulifer* sp. (1,3%) e *Bolbophorus levantinus* (1,8%). Em relação as análises filogenéticas, Strigeidae gen. sp., agrupou-se com *Cotylurus* sp. do Brasil, *Uvulifer* sp. do México e com um isolado de *Ichthyocotylurus erraticus* do Reino Unido, sendo as diferenças entre estes isolados de 1,8%, 0,4%, e 0,9%, respectivamente (Tabela 24). Considerando-se sequências da região ITS, Strigeidae gen. sp. não se agrupou com as espécies consideradas nas análises (Figura 20). A comparação pareada entre estas sequências revelaram diferenças entre 12,7 e 16,3% (Tabela 25).

As análises de sequências COI também não demonstraram agrupamento entre Strigeidae gen. sp. e outras espécies com sequências disponíveis no GenBank, sendo verificadas diferenças entre 16,3 -19,4% em relação às outras sequências utilizadas para as análises (Figura 21). O gênero que apresentou maior similaridade foi *Ichthyocotylurus*, contudo diferenças de 15% e 16% foram verificadas entre Strigeidae gen. sp. respectivamente com *Ichthyocotylurus* sp. 3 e *I. pileatus* (Tabela 26).

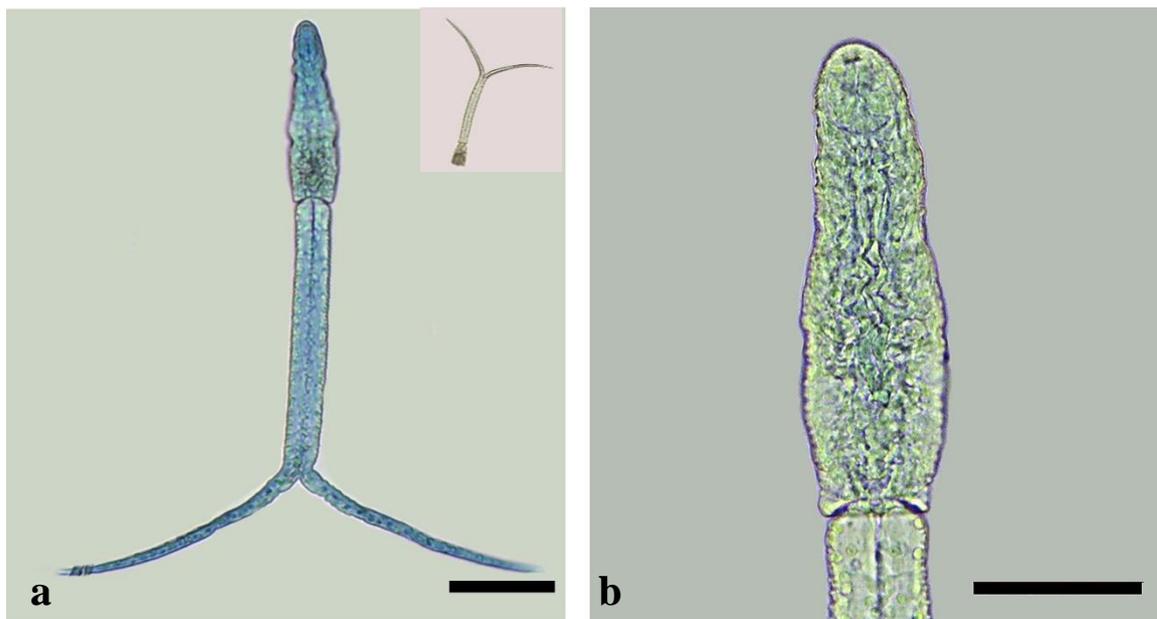


FIGURA 23- Strigeidae gen. sp. (a) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada na Cidade Administrativa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. No canto superior direito encontra-se a larva em posição de repouso. (b) Detalhe do corpo da cercária. Escalas: 100 μm (a), 50 μm (b).

TABELA 27- Dados morfométricos de cercárias de Strigeidae gen. sp. encontradas em *Biomphalaria straminea* em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, e dados relatados para larvas semelhantes por outros autores. Abreviaturas: Co= comprimento, L= largura.

Espécies		Strigeidae gen. sp.	<i>Furcocercaria</i> N°1
Localidade		Brasil	Uruguai
Referência		Presente estudo	Martonelli <i>et al.</i> , 2013
Corpo	Co	172 ± 4 (165-178)	163 ± 3 (160–165)
	L	31 ± 4 (27-34)	40
Tronco caudal	Co	231 ± 18 (165-240)	240 ± 10 (230–250)
	L	33 ± 4 (27-41)	—
Órgão anterior	Co	35 ± 3 (33-38)	35 ± 5 (30–40)
	L	20 ± 1 (19-21)	20
Furcas	Co	203 ± 8 (178-219)	200 ± 10 (190–210)
	L	15 ± 4 (7-27)	—

5.2.2.3.3- *Apharyngostrigea* sp.

5.2.2.3.3.1- Posição taxonômica

Filo: Platyhelminthes

Subfilo: Neodermata

Classe: Trematoda

Subclasse: Digenea

Ordem: Strigeidida

Subordem: Strigeata

Superfamília: Diplostomoidea Poirier, 1886

Família: Strigeidae Railliet, 1919

Subfamília: Strigeinae Railliet, 1919

Gênero: *Apharyngostrigea* Ciurea, 1927

Espécie: *Apharyngostrigea* sp.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria straminea*.

Localidade: Lagoa da Pampulha (amostra previamente coletada)

5.2.2.3.3.2- Caracterização morfológica e morfométrica

A amostra contendo esta espécie corresponde a larvas fixadas apenas para a análise molecular. O estudo morfológico desta larva (e de metacercárias obtidas experimentalmente) foi previamente realizado por Pinto (2013), sendo a espécie identificada como *Apharyngostrigea* sp. 1.

5.2.2.3.3.3- Estudos moleculares

As sequências parciais do gene 18S agruparam em um mesmo clado *Apharyngostrigea* spp. e Strigeidae spp. (Figura 19). O isolado avaliado no presente trabalho agrupou com Strigeidae sp. da Islândia, não sendo verificadas diferenças moleculares (Tabela 24). Estas duas espécies, juntamente com Strigeidae sp. do Japão, *A. cornu* e *A. pipientis* do Canadá agruparam-se em um mesmo clado, mas com baixo suporte. O isolado de *Apharyngostrigea* sp. do presente estudo difere em 0,7% das

espécies cogenêricas. Além disso, diferencia-se também de *Cotylurus* spp. (1,8%), *I. erraticus* (1,3%), *Uvulifer* sp. (1,3%), *Australapatemon* spp. (0,9%), Strigeidae gen. sp. (1,5%), *Bolbophorus levantinus* (0,7%) e Strigeidae spp. (0,0-0,7%).

A análise das sequências ITS revelou a proximidade entre *Apharyngostrigea* sp. do presente estudo e Strigeidae sp. da Islândia (Figura 20), corroborando os resultados obtidos por 18S. A diferença molecular entre estes isolados foi de 0,3%, o que sugere fortemente que são espécies cogenêricas. Estas amostras agruparam-se também com *A. pipientis* do Canadá e *A. cornu* do México, com diferenças moleculares entre 3,1% e 3,3%. A diferença verificada entre estas duas espécies da América do Norte foi de apenas 0,1%. As análises filogenéticas demonstraram que o gênero *Parastrigea*, representado por *P. diovadena* do México, é um grupo-irmão de *Apharyngostrigea*, diferindo das espécies consideradas nas análises em 6,7-7,4% (Tabela 25).

Finalmente a análise das sequências COI demonstraram o agrupamento das três espécies de *Apharyngostrigea* consideradas nas análises (Figura 21). *Apharyngostrigea* sp. do presente estudo difere 11,3% e 12,2% respectivamente de *A. cornu* e *A. pipientis* do Canadá. Os isolados destas duas espécies, que como na análise por ITS agruparam-se em um mesmo clado, diferem entre si em 6,9% (Tabela 26). Além disso, a topologia das árvores filogenéticas demonstraram que *Apatemon* sp. também do Canadá apresentou-se como grupo irmão de *Apharyngostrigea*, sendo diferenças moleculares entre 15,0% e 16,9% verificadas entre estes táxons.

5. DISCUSSÃO

Apesar da ampla distribuição mundial e da importância médico-veterinária de várias espécies de trematódeos pertencentes à superfamília Diplostomoidea, aspectos básicos da biologia são totalmente desconhecidos para a maioria das espécies. No Brasil, embora cerca de 110 espécies pertencentes a esta superfamília terem sido relatadas em hospedeiros vertebrados, apenas seis espécies possuem moluscos transmissores e ciclos biológicos conhecidos até o momento. Considerando-se os estudos realizados na América Latina, o número de ciclos biológicos conhecidos permanece pequeno (12 espécies). Além disso, vários estudos realizados no Brasil relataram o encontro de cercárias do tipo estrigeocercária ainda não associadas aos respectivos adultos, sendo nestes casos as larvas identificadas como pertencentes aos gêneros de grupo coletivo *Cercaria* (16 espécies) e *Furcocercaria* (3 espécies), ou a determinada família ou gênero (7 larvas). Nesse sentido, novos estudos visando a identificação específica destas larvas são necessários. Embora a escassez de estudos contribua significativamente para a lacuna no conhecimento (sobre os ciclos biológicos) destes parasitos, é importante salientar que a complexidade e dificuldades relacionadas a estudos envolvendo infecções experimentais também dificultam o avanço nesta área de estudo. Nesse sentido, estudos empregando ferramentas moleculares, por possibilitar o link entre estágios larvais e adultos, podem acelerar a descoberta de novas interações biológicas, como verificado nos últimos tempos para algumas espécies de Diplostomoidea principalmente da América do Norte e Europa (MOSZCZYNSKA *et al.*, 2009; LOCKE *et al.*, 2010, 2011, 2015; PEREZ-DEL OLMO *et al.*, 2014; FALTÝNKOVÁ *et al.*, 2014; AKSENOVÁ *et al.*, 2016; GARCIA-VARELA *et al.*, 2015; 2016; STONAYOV *et al.*, 2017). Apesar disso, o único estudo molecular envolvendo representantes da superfamília Diplostomoidea no Brasil eram até o momento baseado apenas na obtenção de sequências de metacercárias de *A. compactum* (LOCKE *et al.*, 2010). Assim, o presente estudo representa a primeira iniciativa de caracterização molecular de larvas de Diplostomoidea obtidas em moluscos na América do Sul.

Um total de 11 amostras de estrigeocercárias obtidas de moluscos oriundos de três coleções aquáticas (Lagoa do Nado, Lagoa da Cidade Administrativa e Lagoa da Pampulha) de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, foram avaliadas, incluindo tanto amostras previamente coletadas quanto obtidas durante novas coletas malacológicas

realizadas para o presente estudo. Um total de 6 diferentes tipos de estrigeocercárias encontradas em *B. straminea* e *G. ticaga* foram avaliadas do ponto de vista morfológico e molecular. Considerando-se outros estudos realizados na área, SOUZA *et al.* (1998) relataram a presença de estrigeocercárias em *B. straminea*, *B. tenagophila* e *B. glabrata* de algumas coleções aquáticas da região metropolitana de Belo Horizonte, sendo as larvas identificadas como pertencentes a família Strigeidae. Mais recentemente, PINTO & MELO (2013b) identificaram através de infecções experimentais larvas de *A. compactum* encontradas em *B. glabrata* e *B. straminea* coletadas na Lagoa da Pampulha. Além destas, cercárias identificadas como *H. triloba*, *Apharyngostrigea* sp. 1 e *Apharyngostrigea* sp. 2 foram relatadas em *B. straminea* durante estudos malacológicos realizadas nesta mesma coleção aquática (PINTO, 2013), sendo algumas destas amostras avaliadas no presente estudo.

Entre as estrigeocercárias encontradas em *B. straminea* durante as coletas malacológicas realizadas na Lagoa da Pampulha e na Lagoa da Cidade Administrativa, encontra-se a larva identificada como *Hysteromorpha* sp. (Diplostomidae). As larvas obtidas foram utilizadas para a realização de estudos experimentais que possibilitaram a obtenção de metacercárias em *P. reticulata*. Embora a morfologia das cercárias e das metacercárias sejam idênticas às descritas para *H. triloba*, os dados moleculares não suportaram a identificação desta espécie, como discutido a seguir.

O gênero *Hysteromorpha* Lutz, 1931 possui apenas duas espécies conhecidas, sendo ambas relatadas em diferentes espécies de aves piscívoras na América do Sul. *Hysteromorpha triloba* (Rud. 1819) é a espécie tipo do gênero, descrita na Europa e considerada de distribuição cosmopolita. A outra espécie, *Hysteromorpha compacta* (Lutz, 1928) foi descrita na Venezuela e desde então não foi relatada em outra localidade ou hospedeiro (DUBOIS, 1938; 1953; 1970; CABALLERO & DIAZ-UNGRIA, 1958; DRAGO *et al.*, 2011). No que se refere aos estágios larvais, uma larva descrita como *Diplostomulum corti* Hughes, 1929 foi associada a *H. triloba* na América do Norte. Esta identificação foi baseada em exemplares fixados e desenhos de um parasito que não foram considerados para publicação, mas, revelaram que as metacercárias foram encontradas encistadas na musculatura e base das nadadeiras de *Ameiurus mela* Rafinisque, 1820 e *Ameiurus nebulosus* Lesueur, 1819 (HUGGHINS, 1954b). Mais recentemente, a presença de metacercárias deste parasito encistadas na pele de peixes foi associada a ocorrência da doença dos pontos pretos na Europa (ILLÁN *et al.*, 2013).

Em relação a estudos experimentais envolvendo este grupo de parasitos, a primeira iniciativa foi realizada por LUTZ (1931). Este autor utilizou cercárias encontradas em *Biomphalaria straminea* (= *Planorbis immunis*) e as usou para infectar experimentalmente peixes e girinos. As metacercárias obtidas da cavidade abdominal destes hospedeiros foram utilizadas para a infecção de diferentes hospedeiros vertebrados (camundongos, ratos, filhotes de gambás, pombos e patos e aves aquáticas criadas em laboratório), sendo poucos adultos com ovos encontrados apenas em *Nyctanassa violacea*. Contudo a morfologia da cercária e das metacercárias identificadas como *H. triloba* por LUTZ (1931) corresponde à descrita para as espécies de *Apharyngostrigea*. Décadas depois, HUGGINS (1954a,b), através de estudos experimentais elucidou o ciclo biológico de uma espécie identificada como *H. triloba* nos EUA, sendo a morfologia dos diferentes estágios larvais descrita. Este autor verificou a presença das metacercárias a partir de 10 dias após a infecção de peixes, sendo a permanência verificada por até 12 semanas. As metacercárias foram encontradas encistadas na base das nadadeiras caudais e na musculatura dos peixes. Um fato interessante de se mencionar é que segundo o autor, os peixes expostos a infecção estiveram quase congelados devido a época de inverno, mas ainda assim as metacercárias encontradas tinham muita atividade (HUGGINS, 1954b). Além disso, *Poecilia* sp. não se demonstrou suscetível à infecção.

As cercárias obtidas experimentalmente no presente estudo apresentam similaridade quanto a morfologia e morfometria com às larvas descritas por HUGGINS (1954b) obtidas a partir de infecções experimentais de moluscos. Além disso, as larvas aqui caracterizadas são semelhantes às obtidas em *B. straminea* encontradas infectadas naturalmente por PINTO (2013) na represa da Pampulha. Em relação à infecção experimental de peixes, as metacercárias obtidas são semelhante às obtidas por HUGHES (1929) e HUGGINS (1954a). Novos estudos visando o melhor entendimento da interação entre peixes e espécies do gênero *Hysteromorpha* são necessários. Embora o número de exemplares infectados impossibilite a realização de inferências conclusivas, a ausência de metacercárias durante a análise de parte dos peixes avaliados aos 7 DAI, mas o encontro de animais infectados aos 70 DAI, é algo curioso. De fato, PINTO (2013) também relata a ausência de parasitos durante a avaliação de exemplares de *P. reticulata* expostos a larvas do parasito. No presente estudo, não foram verificadas a formação de pontos pretos ao redor dos parasitos, como descrito para *H. triloba* na Espanha (ILLÁN *et al.*, 2013). Por outro lado, a localização das metacercárias de

Hysteromorpha sp. verificada neste estudo (musculatura) difere da descrita para isolados norte-americanos identificados como *H. triloba* (LOCKE *et al.*, 2011).

Os resultados das análises moleculares baseadas em sequências dos genes nucleares 18S e ITS revelaram respectivamente 99,7-100% e 100% de similaridade com isolados norte-americanos (México e Canadá) identificados como *H. triloba*. Uma baixa variabilidade intraespecífica (99,9% de similaridade) foi verificada entre sequências ITS obtidas a partir de metacercárias de *H. triloba* encontradas em peixes no Canadá (LOCKE *et al.*, 2011). Considerando-se a região 18S, HERNANDEZ-MENA *et al.* (2017) não verificaram diferenças entre isolados mexicanos de *H. triloba* recuperados de aves (*Nannopterum brasilianus*) no México. As baixas diferenças moleculares e a topologia da árvore filogenética obtidas com o uso da região ITS, sugeriram em uma análise preliminar, que as amostras de cercárias obtidas em *B. straminea* eram coespecíficas com os isolados norte americanos identificados como *H. triloba*, o que não foi corroborado por sequências nucleotídicas obtidas para o gene mitocondrial COI. De fato, a análise destas sequências revelou uma diferença molecular de 6-6,3% entre as amostras do Brasil e do Canadá, além de se agruparem em clados distintos na análise filogenética, sugerindo que são espécies distintas.

Diante da provável existência de espécies crípticas no gênero *Hysteromorpha* sugerida por estes resultados, a obtenção de sequências de *H. triloba* oriundos da mesma área geográfica da localidade tipo (Europa) durante o presente estudo se demonstrou esclarecedora. A análise de sequências COI obtidas de metacercárias recuperadas de peixes na Itália revelou diferenças de 8,3-8,6% e de 6,3-6,6% em relação às amostras do Brasil e do Canadá, apesar de serem idênticas ao se considerar a região ITS. As diferenças moleculares verificadas são superiores as diferenças intraespecíficas relatadas para outros gêneros da família Diplostomidae, como por exemplo, *Posthodiplostomum* (0-1,7%), *Diplostomum* (0-1,5%) e *Austrodiplostomum* (0,9%) (GEORGIEVA *et al.*, 2013; PÉREZ- DEL OLMO *et al.*, 2014; ROSSER *et al.*, 2016; STONAYOV *et al.*, 2017). Além disso, a avaliação de sequências COI de 23 espécimes de *Hysteromorpha* obtidos de diferentes localidades do Canadá por LOCKE *et al.* (2011), revelaram diferença média de 1.5% (0-4.6%), inferiores à verificada na comparação entre os três isolados oriundos de área geográfica distintas (Brasil, Canadá e Itália). Nesse sentido, os resultados obtidos, em especial a topologia da árvore filogenética obtida por COI, sugerem a existência de no mínimo três espécies de *Hysteromorpha* entre as sequências avaliadas, uma em cada área geográfica (Europa,

América do Norte e América do Sul). Um fato que corrobora esta hipótese é que sequências de *Hysteromorpha* sp. obtidas de biguás (*N. brasiliensis*) do estado do Paraná foram 100% idênticas às verificadas nos moluscos de Belo Horizonte.

Os resultados aqui apresentados sugerem pela primeira vez que *H. triloba* pode não ser uma espécie de distribuição cosmopolita como previamente considerado a partir de dados morfológicos. Novos estudos são necessários para se avaliar aspectos taxonômicos relacionados a este gênero, incluindo obtenção de novas amostras e a realização de um estudo morfológico detalhado dos estágios adultos obtidos de cada uma das três grandes áreas geográficas. Além disso, a avaliação de outras regiões moleculares hipervariáveis, como o gene nicotinamida adenina dinucleótido (ND1), pode permitir uma melhor resolução e diferenciação entre estas três prováveis espécies. Além disso, considerando-se os relatos prévios destes parasitos em seus hospedeiros definitivos, é interessante mencionar uma possível especificidade parasitária. De fato, parasitos adultos identificados como *Hysteromorpha triloba* foram relatados em *Nannopterum auritus* (na América do Norte) (FLOWERS *et al.*, 2004; O'HEAR *et al.*, 2012), em *Nannopterum brasiliensis* (na América do Sul) (LUTZ, 1928; DUBOIS, 1938; 1953; 1970; CABALLERO & DIAZ-UNGRIA, 1958; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1970; DRAGO *et al.*, 2011; NORONHA *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2011; HERNANDEZ-MENA *et al.* 2017) e em *Phalacrocorax carbo* (na Europa, Ásia e Austrália) (LÜHE, 1909; CIUREA, 1930; YAMAGUTI, 1939; JOHNSTON, 1942). Nesse sentido, é possível que tenha ocorrido a coevolução entre estes parasitos e seus hospedeiros.

Cercárias de *P. nanum*, aqui relatadas pela primeira vez no Brasil, foram encontradas em *G. ticaga* e identificadas através do estudo morfológico de metacercárias e adulto obtidos experimentalmente. As cercárias pertencem ao tipo monostoma faringeada longifurcada, apresentando características morfológicas gerais (presença de ocelos pigmentados e glândulas de penetração na porção posterior do corpo) similares às descritas para larvas de *Posthodiplostomum* spp. por outros autores (YAMAGUTI, 1975). As medidas das cercárias aqui caracterizadas são semelhantes às descritas para *P. nanum* por OSTROWSKI DE NÚÑEZ (1973), que obteve cercárias em *Uncancylus concentricus* (d'Orbigny, 1835) experimentalmente infectado na Argentina. Do ponto de vista morfológico, a única diferença verificada foi a presença de 3 (ao invés de 4) pêlos sensoriais na porção proximal do tronco caudal nas larvas reportadas na Argentina, diferença que consideramos como variação intraespecífica.

Duas outras larvas, encontradas em *U. concentricus* (Furcocercaria VII) e em *Anisancylus obliquus* (Broderip & Sowerby, 1832) (*Posthodiplostomum* sp.), também na Argentina (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1977; RITOSSA *et al.*, 2013), são maiores do que as larvas de *P. nanum*. No Brasil, uma cercária longifurcada com ocelos foi encontrada em *U. concentricus* e descritas como *Cercaria guaibensis* 5 (VEITENHEIMER-MENDES, 1995). Embora algumas medidas desta cercária sejam semelhantes às encontradas para *P. nanum* no presente estudo, evidências experimentais ou moleculares são necessárias para a associação de *C. guaibensis* 5 com *P. nanum*.

No presente estudo, metacercárias do tipo *Neascus* obtidas com sucesso em *P. reticulata* experimentalmente infectados foram identificadas como *P. nanum* diante da similaridade com formas larvais obtidas por OSTROWSKI DE NÚÑEZ (1973) e PINTO & MELO (2012). As metacercárias caracterizadas por PINTO & MELO (2012) foram encontradas em *P. reticulata* naturalmente infectadas coletadas na represa da Pampulha, local localizado a cerca de 5 km da Lagoa do Nado. Algumas medidas relatadas por estes autores, como o tamanho total do corpo e órgão tribocítico são maiores do que as aqui obtidas, o que consideramos provavelmente resultado da variação na idade dos parasitos ou de diferenças no processo de fixação. De fato, os dados obtidos por PINTO & MELO (2012) foram baseados em espécimes comprimidos, diferente do presente estudo (fixação a quente sem compressão). Em contraste, metacercárias identificadas como *Posthodiplostomum* sp. encontradas em *Galaxias maculatus* Jenyns, 1842 por RITOSSA *et al.* (2013) apresentam medidas menores do que as obtidas para *P. nanum* no presente estudo, indicando tratar-se de espécies distintas, especialmente considerando que ambos os estudos utilizaram processos de fixação similares.

O único parasito adulto obtido foi comparado com os dados relatados para *P. nanum* por diferentes autores (DUBOIS, 1970a; OSTROWSKI DE NÚÑEZ; 1973; DIGIANI, 2000; PINTO *et al.*, 2013d). A descrição de *P. nanum* foi baseada em exemplares imaturos obtidos de *Butorides striata* (Linnaeus, 1758) no Brasil. Uma outra espécie descrita como *Posthodiplostomum antillanum* em Cuba por PÉREZ-VIGUERAS (1944), a qual foi pouco tempo depois sinonimizada com *P. nanum* por DUBOIS & PEREZ-VIGUERAS, 1949. Uma metacercária do tipo *Neascus* foi encontrada na musculatura e fígado de peixes Cypriniformes em Serra Leoa, África por WILLIAMS (1967), que através de infecções experimentais de aves obteve adultos identificados como *P. nanum*. Contudo, DUBOIS (1970) considera que o material

obtido por WILLIAMS (1967) é idêntico a *P. biellipticum* Dubois, 1958, único representante do gênero na África. Estas espécies são bastante similares, tendo como diferenças o tamanho do corpo, dos órgãos sexuais e a relação entre os segmentos. Dada a ampla variabilidade morfológica entre as espécies de *Posthodiplostomum*, estudos moleculares futuros são importantes para se confirmar que *P. biellipticum* e *P. nanum* são de fato espécies distintas.

Na América do Sul, outras seis espécies de *Posthodiplostomum* foram relatadas em diferentes espécies de aves: *Posthodiplostomum grande* (Diesing, 1850), *Posthodiplostomum macrocotyle* Dubois, 1937, *Posthodiplostomum microsicya* Dubois, 1936, *Posthodiplostomum obesum* (Lutz, 1928), *Posthodiplostomum giganteum* Dubois, 1988 e *Posthodiplostomum mignum* Boero, Led & Brandetti, 1972 (revisado por FERNANDES *et al.*, 2015). As análises de dados morfométricos relatados para estas espécies revelam uma ampla variabilidade morfológica, que pode ser resultado de fatores relacionados à idade dos parasitos, tipo de hospedeiro ou diferentes técnicas de fixação utilizadas, uma questão já discutida para *Posthodiplostomum* (PALMIERI, 1977; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, 1995). Contudo, *P. nanum* relatado por diferentes autores apresenta tamanho total e estruturas significativamente menores do que o descrito para *P. microsicya*, *P. grande*, *P. giganteum* e *P. macrocotyle* (revisado por FERNANDES *et al.*, 2015). Além disso, *P. mignum* e *P. obesum* apresentam medidas semelhantes às descritas para *P. nanum*, mas a distribuição da vitelária nessas duas espécies difere da encontrada em *P. nanum*. No entanto, tendo em vista que a maioria dessas diferenças são sutis e sujeitas a variações, como discutido acima, a possibilidade de *P. obesum*, *P. nanum* e *P. mignum* serem a mesma espécie não pode ser descartada.

O estudo molecular realizado a partir dos estágios larvais de *P. nanum* resultou na obtenção das primeiras sequências nucleotídicas de um isolado de *Posthodiplostomum* da América do Sul. Nos últimos anos, os estudos moleculares envolvendo este gênero resultaram na obtenção de sequências nucleotídicas de 11 espécies (algumas não nomeadas) na Europa, América do Norte e Ásia (LOCKE *et al.*, 2010; MOSZCZYNSKA *et al.*, 2009; NGUYEN *et al.*, 2010; STONAYOV *et al.*, 2017). Os resultados aqui obtidos para *P. nanum* não correspondem a nenhuma destas espécies.

Embora a maior parte das sequências disponíveis para *Posthodiplostomum* spp. correspondam aos genes ITS e COI, a utilização de um fragmento do gene 18S se demonstrou adequada para uma triagem inicial e para a determinação do possível

gênero. A comparação das sequências 18S obtidas para *P. nanum* com outras sequências existentes para isolados cogenêricos da Índia, EUA, Canadá e Japão, revelaram diferenças consideravelmente pequenas (0-0,3%), o que está relacionado ao fato deste gene ser altamente conservado (MOSZCZYNSKA *et al.*, 2009). Interessantemente, um isolado de *Ornithodiplostomum* considerado para a construção da árvore filogenética agrupou com as sequências de *Posthodiplostomum* (100% de similaridade), sinalizando a proximidade filogenética entre estes gêneros (STONAYOV *et al.*, 2017).

Uma comparação das sequências ITS obtidas para *P. nanum* neste estudo com dados publicados para outras espécies de *Posthodiplostomum*, e para *Ornithodiplostomum* spp. e *Mesophorodiplostomum pricei* sugere uma situação taxonômica complexa. As análises filogenéticas realizadas a partir de sequências ITS sugerem fortemente a parafilia do gênero *Posthodiplostomum*. Neste sentido, as sequências da espécie tipo do gênero, *P. cuticola*, tornam-se extremamente importantes para o avanço da taxonomia desse grupo de trematódeos. Uma análise recente de sequências concatenadas das regiões ITS1, ITS2 e 28S demonstrou que *P. cuticola* forma um clado a parte de outras quatro espécies cogenêricas, incluindo duas espécies identificadas (*P. centrarchi*, *P. brevicaudatum*) (KVACH *et al.*, 2017). Considerando-se a região ITS completa (não disponível para *P. cuticola*), as diferenças entre *P. nanum* e *Posthodiplostomum* spp. foram 6,0-9,3%. Em comparação, a diferença interespecífica entre espécies de *Ornithodiplostomum*, um gênero monofilético de acordo com nossas análises, foi substancialmente menor (0,0-1,3%). Em outros gêneros da superfamília Diplostomoidea, diferenças interespecíficas menores ou semelhantes às encontradas para *Posthodiplostomum* spp. foram relatados entre espécies de *Diplostomum* (1,8-4,6%, GALAZZO *et al.*, 2002), *Uvulifer* (2-7,8%, LÓPEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2017); *Tylodelphys* (0,7-8,3%, BLASCO-COSTA *et al.*, 2017) e *Apatemon* (0,9-2,1%, BLASCO-COSTA *et al.*, 2016). Por outro lado, diferenças relativamente pequenas foram relatadas entre diferentes gêneros, por exemplo, entre *Tylodelphys* spp. e *Diplostomum* spp. (5,3-5,9%, BLASCO-COSTA *et al.*, 2017) e entre *Apatemon* e *Australapatemon* (4,4%, BLASCO-COSTA *et al.*, 2016). O agrupamento de ITS de *M. pricei* em um clado bem suportado juntamente com *Posthodiplostomum* sp. 8 e especialmente *P. centrarchi*, foi um achado intrigante observado nas análises filogenéticas. As distâncias intra e intergenéricas para a região ITS entre espécies consideradas acima, juntamente com a topologia da árvore filogenética obtida e distâncias moleculares entre os táxons incluídos neste clado (0,9-1,7%), sugerem que

essas espécies são cogenéricas. Curiosamente, a característica principal que distingue *Mesophorodiplostomum* de *Posthodiplostomum* é a disposição intertesticular do ovário no primeiro (DUBOIS, 1936; NIEWIADOMSKA, 2002a). Em relatos anteriores de *P. cuticola* e *P. nanum*, o ovário é pré-testicular, mas sua posição pode variar nos adultos de *P. centrarchi* (PALMIERI, 1977). Por outro lado, o ovário nas metacercárias de *P. centrarchi* e *P. brevicaudatum* é intertesticular (STOYANOV *et al.*, 2017), como verificado em *Mesophorodiplostomum*. Os resultados obtidos por ITS sugerem que algumas sequências atualmente identificadas como *Posthodiplostomum* podem pertencer ao gênero *Mesophorodiplostomum*, ou caso contrário, podem indicar a sinonímia de *Mesophorodiplostomum* e *Posthodiplostomum*.

As sequências COI obtidas para *P. nanum* revelaram diferenças interespecíficas significativas em relação às espécies cogenéricas (14,3-20,1%). A análise filogenética considerando-se este marcador molecular revelou que *P. nanum* pertence a um clado contendo vários isolados de *Posthodiplostomum* spp., além de *M. pricei* e *Ornithodiplostomum* spp. No entanto, as relações dentro deste clado não estão bem resolvidas, exceto para *Ornithodiplostomum* spp., e um clado composto por *Posthodiplostomum* sp. 1 e *Posthodiplostomum* sp. 2. Curiosamente, novamente a espécie tipo do gênero, *P. cuticola*, é distante e basal em relação as outras espécies de *Posthodiplostomum*, suportando a parafilia deste gênero verificada pela análise de sequências ITS.

A terceira espécie de Diplostomidae encontrada em moluscos de Belo Horizonte foi *A. compactum*, espécie previamente identificada neste local através de estudos envolvendo infecções experimentais (PINTO & MELO, 2013b). As larvas reavaliadas no presente estudo foram previamente obtidas em *B. straminea*. *Austrodiplostomum compactum* foi descrito pela primeira vez por LUTZ (1928) como *Diplostomum (Austrodiplostomum) compactum*, a partir de exemplares encontrados em *N. brasiliensis* na Venezuela. Desde então foi relatado no cormorão neotrópico *Nannopterum brasiliensis* na América do Sul (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1968, 1982, DRAGO *et al.*, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2016) e no cormorão-de-duas pontas *Nannopterum auritus* na América do Norte (FLOWERS *et al.*, 2004). Nos últimos anos, a taxonomia das espécies de *Austrodiplostomum* tornou-se confusa, apesar da existência de apenas três espécies nominais descritas. Além de *A. compactum*, uma outra espécie, *Austrodiplostomum mordax* Szidat & Nani, 1951, foi descrita na Argentina (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1968). Além disso, DRONEN (2009) descreveu uma nova

espécie, *Austrodiplostomum ostrowskiae*, de *N. auritus*, no Texas, EUA, considerando *A. mordax* e *A. compactum* sinônimos, sendo *A. mordax* o nome válido. Recentemente, OSTROWSKI DE NÚÑEZ (2017), durante a redescritção de *A. compactum*, demonstrou que *A. compactum* e *A. mordax* possuem importantes diferenças morfológicas e morfométricas, além de diferenças biológicas como a localização das metacercárias no peixe hospedeiro intermediário e distribuição geográfica. Além disso, *A. ostrowskiae* foi considerado um sinónimo júnior de *A. compactum* (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2017). De fato, estudos recentes revelaram que aspectos da morfologia e biologia dos estágios larvais destes parasitos identificados como *A. ostrowskiae* na América do Norte (ROSSER *et al.*, 2016; GARCÍA-VARELA *et al.*, 2016) são semelhantes aos observados na América do Sul (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1982; PINTO & MELO, 2013b).

Os primeiros hospedeiros intermediários de *A. compactum* são moluscos planorbídeos do gênero *Biomphalaria*, sendo *B. prona*, *B. straminea* e *B. glabrata* descritos como hospedeiros intermediários naturais da espécie na Argentina, Brasil e Venezuela (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1982; PINTO & MELO, 2013). As cercárias avaliadas no presente estudo são similares às relatadas em *B. straminea* na Argentina e no Brasil (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1982, PINTO & MELO, 2013) em *Biomphalaria havanensis* (Pfeiffer, 1839) e nos EUA (ROSSER *et al.*, 2016). Em relação aos segundos hospedeiros intermediários, desde meados da década de 1990, um número crescente de registros deste parasito em peixes vem sendo realizado no Brasil e em vários outros países do continente americano (KOHN *et al.*, 1995; OVERSTREET & CURRAN, 2004; GALAVIZ-SILVA *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2013). Na maioria destes relatos, as metacercárias foram registradas parasitando o globo ocular, humor aquoso e cérebro sendo discutido a provável relação com a ocorrência de catarata, atraso no desenvolvimento e cegueira, tornando o peixe suscetível à predação, o que facilita a sua transmissão para o hospedeiro definitivo (EIRAS, 1994).

As análises moleculares realizadas a partir dos marcadores nucleares 18S e ITS demonstraram 100% de similaridade entre as amostra de *A. compactum* em *B. straminea* de Belo Horizonte e isolados desta espécie (alguns identificados como *A. ostrowskiae*) estudados nos EUA. Em relação ao marcador 18S, O'HEAR *et al.* (2014) compararam sequências de *A. compactum* com *Diplostomum spathaceum* e observaram que as sequências eram 100% idênticas, o que pode ser resultado da avaliação de uma região extremamente conservada ou erro na identificação do parasito. Uma espécie

identificada como Diplostomidae sp. (KT728774) encontrada nos EUA difere em apenas um nucleotídeo (0,3%) com o marcador 18S, em relação às sequências de *A. compactum*, sendo possível que se trate de uma espécie do mesmo gênero.

A maioria dos estudos moleculares envolvendo espécies do gênero *Austrodiplostomum* utilizaram sequências COI, resultando na elucidação de novas interações entre estes parasitos e seus hospedeiros intermediários e definitivos, principalmente na América do Norte (O'HEAR *et al.*, 2014; GARCÍA-VARELA *et al.*, 2015; LOCKE *et al.*, 2015; ROSSER *et al.*, 2016). No presente estudo a análise filogenética realizada a partir de sequências COI agrupou as cercárias de *A. compactum* com os isolados desta espécie dos EUA, Canadá, México e Peru. A diferença molecular verificada entre estes isolados (0,3-1,1%) revelam que são isolados coespecíficos com baixa variabilidade intraespecífica. Os resultados moleculares obtidos confirmam a identificação de *A. compactum* realizada a partir da abordagem experimental realizada previamente por PINTO & MELO (2013b) na mesma área de estudo. As sequências de outros isolados de *Austrodiplostomum*, identificados como *Austrodiplostomum* sp. e *Austrodiplostomum* sp. 2, apresentaram diferenças de 8,5% e 10%, respectivamente, em relação às sequências obtidas no presente estudo. Uma diferença similar (10%) é verificada entre estes dois isolados norte-americanos, o que sugere a existência de no mínimo três espécies deste gênero nas Américas. Diante das diferenças biológicas e distribuição geográfica, estudos moleculares futuros envolvendo *A. mordax* provavelmente revelarão que esta espécie não corresponde a nenhum destes isolados norte-americanos ainda não nomeados.

Três espécies de trematódeos pertencentes à família Strigeidae foram encontradas em *B. straminea* no presente estudo: *Cotylurus* sp., Strigeidae n. sp. e *Apharyngostrigea* sp. As estrigeocercárias aqui identificadas como *Cotylurus* sp. são semelhantes às larvas previamente descritas como *Cercaria caratinguensis* por RUIZ (1953), as quais foram encontradas em *B. glabrata* do estado de Minas Gerais. Desde então, vários autores registraram larvas semelhantes em diferentes espécies de moluscos no Brasil (MILWARD DE ANDRADE & CAMPOS, 1969; ESPÍNDOLA *et al.*, 1992, SOUZA *et al.* 1981, 1998, CARVALHO *et al.* 2001; MORAES *et al.*, 2009; EDUARDO *et al.* 2012; OHLWEILER *et al.*, 2013). Larvas semelhantes foram encontradas na Argentina (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1972; MARTORELLI *et al.*, 2013; FERNANDEZ & HAMANN, 2017) e Venezuela (NASIR *et al.*, 1979). Estudos experimentais realizados a partir de larvas semelhantes a *C. caratinguensis* encontradas

em *B. straminea* de Minas Gerais foram realizados por BASCH (1969) e revelaram a presença de uma nova espécie descrita como *Cotylurus lutzi*. Embora as cercárias e metacercárias de *Cotylurus* sp. avaliadas no presente estudo sejam semelhantes e da mesma área geográfica, a obtenção e estudo morfológico dos parasitos adultos é ainda necessária para a identificação definitiva da nossa espécie como *C. lutzi*.

Os trematódeos pertencentes ao gênero *Cotylurus* parasitam, na fase adulta, aves, sendo moluscos aquáticos tanto os primeiros quanto os segundos hospedeiros intermediários (YAMAGUTI, 1975; NIEWIADOMSKA, 2002b). Após a emergência das cercárias, estas penetram nos moluscos para a formação de metacercárias do tipo *Tetracotyle*, as quais possuem formato piriforme característico. No Brasil, três espécies do gênero foram relatadas até o momento: *Cotylurus cornutus* (Rudolphi, 1808) encontrada em *Anas platyrhynchos* Linnaeus, 1758 (= *Anas boschas domestica*) e *Columba livia* Gmelin, 1789 (DUBOIS 1938; 1953), *Cotylurus gallinulae gallinulae* (Lutz, 1928) em *Gallinula galeata galeata* (Lichtenstein, 1818) (LUTZ, 1928) (= *Gallinula chloropus galeata*) e *C. lutzi*, espécie cujo hospedeiro definitivo natural permanece desconhecido (BASCH, 1969). A morfologia geral das cercárias avaliadas, incluindo a disposição das glândulas de penetração e presença de ocelos não pigmentados, e das metacercárias encontradas em moluscos naturalmente infectados, é compatível com a descrita para estes estágios larvais de diferentes espécies de *Cotylurus* (BASCH, 1969; YAMAGUTI, 1975; FALTÝNKOVÁ *et al.*, 2007).

No presente estudo a infecção experimental de *B. glabrata* criadas em laboratório por cercárias de *Cotylurus* sp. não resultou em sucesso. Tendo em vista relatos prévios da infecção destes planorbídeos por metacercárias do tipo *Tetracotyle*, tanto naturalmente (RUIZ, 1953) quanto experimentalmente (BASCH, 1969), novos estudos são necessários para a avaliação de aspectos relacionados à suscetibilidade de *Biomphalaria* spp. a larvas de *Cotylurus*. Fatores como a idade dos moluscos, tempo de infectividade das cercárias após emergência e o número de cercárias a serem utilizadas podem influenciar o não sucesso das infecções experimentais.

Estudos moleculares envolvendo espécies do gênero *Cotylurus* são escassos. De fato, sequências 18S eram até então inexistentes, ao passo que apenas uma sequência de ITS e três de COI estão disponíveis no GenBank para apenas espécies do gênero, *C. cornutus* e *C. gallinulae* (HERNANDEZ-MENA *et al.*, 2017; SOLDÁNOVA *et al.*, 2017), ambas já relatadas em aves no Brasil (FERNANDES *et al.*, 2015). Apesar das poucas informações moleculares existentes, as sequências disponíveis possibilitaram a

identificação do gênero das cercárias e metacercárias obtidas no presente estudo. As sequências ITS, além de revelarem que as cercárias e metacercárias encontradas em *B. straminea* são idênticas, demonstraram que são cogenéricas com o isolado de *C. gallinulae* do México (HERNANDEZ-MENA *et al.*, 2017), sendo verificada uma divergência molecular de 5,1%. Considerando-se outros gêneros pertencentes à família Strigeidae, esta diferença interespecífica é maior que a verificada para *Apatemon* (0,9-2,1%), *Parastrigea* (0,5-1,7%), *Australapatemon* (0,6-1,9%) e *Apharyngostrigea* (1,7%) (LOCKE *et al.*, 2010; HERNÁNDEZ-MENA *et al.*, 2014; BLASCO-COSTA *et al.*, 2016; GORDY *et al.*, 2017). A diferença entre sequências ITS de diferentes gêneros de Strigeidae variou entre 4,4 e 18,4%, sendo o valor mais baixo verificado entre os gêneros *Apatemon* e *Australapatemon* (BLASCO-COSTA *et al.*, 2016).

Com o marcador COI, as diferenças moleculares entre *Cotylurus* sp. do presente estudo e *C. gallinulae* do México e Canadá, e *C. cornutus* da Noruega variaram entre 11% e 12,5%. Diferenças interespecíficas dentro dos diferentes gêneros de Strigeidae variaram entre 7,5% e 15,6% (BLASCO-COSTA *et al.*, 2016). As diferenças encontradas entre *Cotylurus* spp. no presente estudo são semelhantes à verificada para as espécies de *Parastrigea* (9,31-11,4%), *Ichthyocotylurus* (10%), e *Australapatemon* (12,6-14,1%) (HERNÁNDEZ-MENA *et al.*, 2014; BLASCO-COSTA *et al.*, 2016; GORDY *et al.*, 2017). Uma exceção é verificada entre duas espécies indeterminadas do gênero *Apatemon* (*Apatemon* sp. 1 e *Apatemon* sp. 1x), em que as diferenças verificadas foram menores (3,4-4,6%) (BLASCO-COSTA *et al.*, 2016). Considerando as outras espécies de *Apatemon*, as diferenças são maiores entre as outras espécies do gênero (8,5-15%) (BLASCO-COSTA *et al.*, 2016; GORDY *et al.*, 2017).

É importante mencionar que a larva de *Cotylurus* sp. assemelha-se morfológicamente às cercárias das espécies do gênero *Australapatemon*, especialmente pelo tamanho e presença de ocelos não pigmentados. No presente estudo, foram obtidas para efeitos comparativos sequências de uma cercária molecularmente identificada como *Australapatemon* sp., a qual havia sido previamente encontrada em *B. glabrata* e identificada por critérios morfológicos como *C. caratinguensis* (dados não publicados). Sequências do gene 18S revelaram que esta cercária difere em 2,0% de *Cotylurus* sp., sugerindo que são espécies de gêneros distintos. Além disso, as sequências de *Australapatemon* sp. do Brasil e *Australapatemon burti* do México e *Australapatemon* sp. do Canadá diferem em apenas um nucleotídeo (0,2%). Os resultados obtidos através da análise de sequências ITS também confirmaram a identificação de *Australapatemon*

sp. A diferença interespecífica entre sequências das larvas avaliadas no presente estudo e *A. burti* do México, *A. mclaughlini* do Canadá, *A. niewiadomski* da Nova Zelândia e *Australapatemon* sp. do Canadá variou entre 1,4-1,9%, confirmando que são espécies cogenéticas. Além disso, as análises filogenéticas demonstraram que estas diferentes espécies de *Australapatemon* formam um clado com significativo suporte. *Australapatemon* sp. é uma espécie que ainda não apresenta sequências disponíveis no GenBank. No Brasil, apenas uma espécie deste gênero, *Australapatemon bdello cystis* (Lutz, 1921) foi registrada até agora (FERNANDES *et al.*, 2015), sendo a participação de *B. straminea* como hospedeiro intermediário relatada (LUTZ, 1921; DUBOIS, 1970). Considerando-se outros países da América do Sul, *Australapatemon magnacetabulum* Dubois, 1988 foi relato em aves no Paraguai, sendo a infecção de *B. tenagophila* por esta espécie verificada na Argentina (DUBOIS, 1988; DAVIES & OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2012). Além disso, duas outras espécies, *A. burti* e *Australapatemon canadensis* Dubois & Rausch, 1950 foram relatadas no Chile e Argentina, respectivamente. Nesse sentido, é possível que *Australapatemon* sp. seja uma destas espécies ainda não relatadas no Brasil. Estudos futuros visando a caracterização morfológica destas cercárias, a obtenção de adultos por infecções experimentais, bem como a aquisição de sequências COI, poderão contribuir para se avançar na identificação específica desta espécie.

A larva aqui identificada preliminarmente como Strigeidae gen. sp. não possui similaridade com nenhuma das cercárias de Diplostomoidea cujo ciclo biológico já foi elucidado em diferentes partes do mundo. Uma larva com morfologia e medidas semelhantes foi encontrada em *B. tenagophila* e descrita como *Furcocercaria* N°1 no Uruguai (MARTONELLI *et al.*, 2013). Os estudos experimentais realizados com estas larvas não resultaram na obtenção de outros estágios evolutivos, o que impossibilitou a identificação do gênero deste parasito. Embora os estudos moleculares tenham resultado na obtenção de sequências de todos os marcadores avaliados, a análise destas sequências também não resultou na identificação deste parasito.

De fato, com nenhum dos três marcadores moleculares utilizados foi verificado um percentual de similaridade superior a 90% entre Strigeidae gen. sp. e outros Diplostomoidea com sequências disponíveis no GenBank. As análises realizadas com sequências do gene 18S revelaram 80-89% de similaridade com sequências de diferentes espécies de Strigeidae, incluindo, *Ichthyocotylurus erraticus* (Rudolphi, 1809) do Reino Unido, *Parastrigea diovadena* Dubois & Macko, 1972, *Parastrigea*

plataleae Hernández-Mena *et al.*, 2014 do México, Strigeidae sp. de Israel e Strigeidae sp. do Japão. Na árvore filogenética, Strigeidae gen. sp. do Brasil agrupou-se com as sequências *Uvulifer* sp. do México e *I. erraticus* do Reino Unido e com *Cotylurus* sp. obtido no presente estudo. O agrupamento de *Uvulifer* sp. (Diplostomidae) com algumas espécies de Strigeidae revela a proximidade entre alguns membros destas famílias. De fato, estudos filogenéticos robustos e recentes revelaram a parafilia de Diplostomidae, contudo, um rearranjo entre os gêneros atualmente incluídos nesta família ainda não foi realizado (BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017; HERNÁNDEZ-MENA *et al.*, 2017).

Considerando-se as sequências da região ITS, as análises moleculares revelaram 12,7-16,3% de diferença entre Strigeidae gen. sp. e as outras espécies de Strigeidae consideradas para comparação. A diferença para esta região entre os diferentes representantes pode chegar a 18,4 % (BLASCO-COSTA *et al.*, 2017). Em relação às análises filogenéticas, os resultados revelaram a disposição desta espécie em um clado distinto e basal em relação às outras espécies de Strigeidae avaliadas.

Resultado semelhante foi obtido com as sequências COI. As espécies com maior proximidade em relação a Strigeidae gen. sp. foram *Ichthyocotylurus* spp. (15-16%) e *Cotylurus* sp. (16,3%) do Brasil. Contudo, as cercárias destes dois gêneros diferem significativamente das larvas de Strigeidae gen. sp., especialmente pela presença de ventosa ventral e ocelos não pigmentados (YAMAGUTI, 1975; FALTÝNKOVÁ *et al.*, 2007). Novos estudos são necessários para se avançar na identificação taxonômica de Strigeidae gen. sp. bem como para a elucidação de seu ciclo biológico. A futura disponibilidade de sequências nucleotídicas obtidas dos respectivos adultos, ou de espécies cogenéricas, será uma importante contribuição. Tendo em vista a maior disponibilidade de sequências nucleotídicas para uma diversidade de gêneros de Diplostomoidea existentes na América do Norte e Europa, é possível que Strigeidae gen. sp. pertença a um gênero Neotropical. Considerando-se os 8 gêneros destes parasitos relatados em vertebrados no Brasil, apenas dois, *Ophiosoma* Szidat, 1928 e *Duboisella* Baer, 1938, parasitos respectivamente de aves aquáticas e marsupiais, não possuem ainda nenhuma sequência molecular disponível para comparação. Por outro lado, é possível que as larvas encontradas em *B. straminea* correspondam a um gênero ainda não assinalado no Brasil.

Finalmente, o estudo molecular confirmou a identificação morfológica das cercárias de *Apharyngostrigea* sp., as quais foram previamente obtidas de *B. straminea*

coletadas na represa da Pampulha durante os estudos realizados por PINTO (2013). Esta cercária, denominada por este autor como *Apharyngostrigea* sp. 1, apresenta morfologia e medidas compatíveis com as larvas de *Apharyngostrigea simplex* (Johnston, 1904) descrita de *B. straminea* da Argentina (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1989).

As espécies do gênero *Apharyngostrigea* Ciurea, 1924 são trematódeos conhecidos por parasitar principalmente aves da família Ardeidae. Existem mais de 20 espécies nominais descritas, mas apenas oito delas são consideradas atualmente válidas (DUBOIS, 1968; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1989; NIEWIADOMSKA, 2002a). Três espécies foram relatadas no Brasil: *Apharyngostrigea brasiliana* (Szidat, 1928), encontrada em *Butorides striata* e *Nyctanassa violacea* (Linnaeus, 1758) (ARRUDA *et al.*, 2001), *Apharyngostrigea cornu* (Zeder, 1800) relatada em *Trigrisoma lineatum mamoratum* (Vieillot, 1817) e em *A. alba* (TRAVASSOS *et al.* 1969; DUBOIS, 1970a, b), e *Apharyngostrigea multiovata* (PÉREZ-VIGUERAS, 1944) também encontrada em *A. alba* (DUBOIS, 1968, 1970a; NORONHA *et al.*, 2009). As outras três espécies existentes do gênero relatadas na América do Sul são *Apharyngostrigea simplex* (Johnston, 1904), *Apharyngostrigea ardearum* (Lutz, 1928) e *Apharyngostrigea squamatoconus* Rietschel & Werding, 1978, encontradas em diferentes espécies de aves na Argentina, Venezuela e Colômbia, respectivamente (FERNANDES *et al.*, 2015). Além disso, larvas deste tipo, identificadas como *Apharyngostrigea* sp., foram relatadas em Guadalupe e no Brasil (NASSI, 1987; DIAS *et al.*, 2002).

O estudo molecular realizado a partir das cercárias de *Apharyngostrigea* sp. revelou que não existem (depositadas no GenBank) sequências compatíveis para identificação específica. Considerando-se os marcadores nucleares avaliados, verificou-se o agrupamento de *Apharyngostrigea* sp. com isolados norte-americanos de *A. cornu* e *Apharyngostrigea pipientis* (Faust, 1918), únicas espécies do gênero com sequências disponíveis. Diferenças de 0,7% e 3,2-3,3%, encontradas na avaliação de sequências 18S e ITS, respectivamente, revelaram que *Apharyngostrigea* sp. é uma espécie distinta em relação aos isolados cogenéricos dos EUA, o que foi confirmado também pelas sequências COI (diferença molecular de 11,3-12,2%). As análises filogenéticas realizadas a partir das sequências 18S e ITS aqui obtidas agruparam com um bom suporte *Apharyngostrigea* sp. do Brasil com uma sequência identificada como *Strigeidae* sp. de Israel. Uma diferença de 0,3% foi verificada entre estes isolados com ambos os marcadores nucleares utilizados, sendo possível que sejam coespecíficos. A confirmação desta hipótese é impossibilitado pela ausência de sequências COI para o

isolado da Islandia identificado como Strigeidae sp. Os dados filogenéticos obtidos sugerem que um isolado também identificado como Strigeidae sp. no Japão é provavelmente uma espécie de *Apharyngostrigea*.

Das 6 espécies de Diplostomoidea encontradas em moluscos aquáticos de Belo Horizonte no presente estudo, apenas uma espécie apresentou sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank que possibilitaram a identificação taxonômica em nível específico. Este resultado reflete a principal dificuldade inerente ao estudo molecular de trematódeos na região neotropical: a ausência de sequências referências para a maioria quase que absoluta das espécies existentes nesta região. De fato, considerando-se os representantes da superfamília Diplostomoidea apenas 4 espécies possuíam alguma sequência disponível registradas para a América do Sul.

Tendo em vista que o estudo taxonômico de trematódeos é baseado quase que exclusivamente na morfologia dos estágios adultos, as dificuldades encontradas são ainda mais significativas em estudos envolvendo larvas de trematódeos encontradas em moluscos, para as quais o estudo morfológico na maioria das vezes não resulta na determinação das categorias taxonômicas inferiores (gênero e espécie). De fato, estudos recentes realizados no Brasil utilizando abordagem molecular na identificação de larvas de outros grupos de trematódeos que não são Diplostomoidea, revelaram também a dificuldade para a identificação específica, sendo na maioria das vezes possível a identificação por abordagem filogenética apenas do gênero ou família (PINTO *et al.*, 2014, 2015b, 2016, 2017). Nesse sentido, estudos envolvendo a abordagem taxonômica integrativa são importantes para o avanço nesta área. Neste tipo de abordagem os estudos morfológicos, moleculares e experimentais utilizados em conjunto, fornecem informações robustas sobre diferentes aspectos da biologia e taxonomia das espécies avaliadas (BLASCO-COSTA & POULIN, 2017). No presente estudo, esta abordagem foi aqui realizada com sucesso e permitiu a identificação das larvas de *P. nanum*.

Por outro lado, são muitas as dificuldades inerentes a elucidação de ciclos biológicos, especialmente de Diplostomoidea dada a complexidade das relações biológicas algumas altamente específicas entre os diferentes hospedeiros. Nesse sentido, a conexão entre as cercárias encontradas em moluscos com parasitos adultos recuperados de hospedeiros definitivos naturalmente infectados pode ser uma abordagem que acelere a identificação de novas interações biológicas envolvendo estes parasitos. Ao certo, tais estudos poderão resultar na futura identificação específica de algumas das larvas de Diplostomoidea aqui avaliadas.

Embora a identificação específica não seja possível em muitos casos, como discutido acima, é importante ressaltar que a determinação por abordagem molecular dos gêneros ou famílias por comparação com dados existente para a fauna principalmente da Europa e América do Norte, pode ser considerado um avanço importante no estudo de larvas de trematódeos no Brasil. Este nível de identificação permite inferir importantes informações como prováveis hospedeiros e padrão de ciclo biológico. Tais informações podem ser úteis em abordagens relacionadas ao manejo e conservação da vida silvestre bem como para a identificação e vigilância das espécies com potencial importância na aquicultura.

6. CONCLUSÕES

Seis espécies de trematódeos da superfamília Diplostomoidea foram identificadas em moluscos de coleções aquáticas de Belo Horizonte a partir de estudos morfológicos, experimentais e moleculares.

Biomphalaria straminea participa como primeiro hospedeiro intermediário no ciclo biológico de *Hysteromorpha* sp., *Austrodiplostomum compactum*, *Cotylurus* sp., Strigeidae n. sp. e *Apharyngostrigea* sp.

Gundlachia ticaga é o primeiro hospedeiro intermediário de *Posthodiplostomum nanum*.

A ocorrência de espécie crípticas no gênero *Hysteromorpha* é relatada pela primeira vez.

Estudos filogenéticos revelaram que o gênero *Posthodiplostomum* é parafilético.

A ausência de sequências referências dificulta a identificação específica, por abordagem molecular, de larvas de Diplostomoidea encontradas em moluscos no Brasil.

ANEXO

Artigo aceito para publicação:

López-Hernández D, Locke SA, Melo AL, Rabelo EML, Pinto HA 2018. Molecular and experimental assessment of the life cycle of *Posthodiplostomum nanum* Dubois 1937 (Trematoda: Diplostomidae) from Brazil, with comments on the paraphyly of the genus *Posthodiplostomum* Dubois, 1936". *Infect Genet Evol* (*In press*).

7. REFERÊNCIAS

Acosta AA, Caffara M, Fioravanti ML, Utsunomia R, Zago AC, Franceschini L & Silva RJ 2016. Morphological and molecular characterization of *Clinostomum detruncatum* (Trematoda: Clinostomidae) metacercariae infecting *Synbranchus marmoratus*. *Journal of Parasitology* 102: 151-156.

Aguirre-Macedo AL, May-Tec A, Aquino F, Cremonte A & Martorelli SR 2016. Diversity of helminth parasites in aquatic invertebrate hosts in Latin America: how much do we know? *Journal of Helminthology* 9: 1-13.

Aksenova OV, Beshpalaya YV, Bolotov IN, Kondakov AV & Sokolova SE 2016. First molecular identification of *Australapatemon burti* (Miller, 1923) (Trematoda: Digenea: Strigeidae) from an intermediate host *Radix labiata* (Rossmassler) (Gastropoda: Lymnaeidae) in Europe. *Zootaxa* 4132: 588-590.

Alda P, Bonel N, Panei C, Cazzaniga NJ & Martorelli SR 2015. First molecular identification of *Ascocotyle (Phagicola) longa* in its first intermediate host the mud snail *Heleobia australis*. *Acta Parasitologica* 60: 791-795.

Arruda VSD, Pinto RM & Muniz-Pereira, LC 2001. New host and geographical records for helminths parasites of Ardeidae (Aves, Ciconiiformes) in Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 18: 225-232.

Artigas PT, Perez MD, Otsuko JM & Nishimori G 1970. Levantamentos parasitológicos, em particular a esquistossomose mansônica, nas cidades de Itanhaém e Mongaguá (Litoral Sul do Estado de São Paulo). *Revista de Saúde Pública* 4: 35-43.

Avise J C, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE & Saunders NC 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.

Barragán-Sáenz FA, Sánchez-Nava P, Hernández-Gallegos O & Salgado-Maldonado G

2009. Larval stages of trematodes in gastropods from Lake Chicahuapan, state of Mexico, Mexico. *Parasitology Research* 105: 1163-1167.

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

Basch PF 1970. Relationships of some larval strigeids and echinostomes (Trematoda): hyperparasitism, antagonism, and “immunity” in the snail host. *Experimental Parasitology* 27: 93-216.

Basch PF, Lie KJ & Heyneman D 1969. Antagonistic interaction between strigeid and schistosome sporocysts within a snail host. *Journal of Parasitology* 55: 753-758.

Blasco-Costa I & Locke SA 2017. Life history, systematics and evolution of the Diplostomoidea Poirier, 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* 91: 647-656.

Blasco-Costa I & Poulin R, Presswell B 2016. Species of *Apatemon* Szidat, 1928 and *Australapatemon* Sudarikov, 1959 (Trematoda: Strigeidae) from New Zealand: linking and characterising life cycle stages with morphology and molecules. *Parasitology Research* 115: 271-289.

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.

Borges JN, Costa VS, Mantovani C, Barros E, Santos EGN, Mafra CL & Santos CP 2017. Molecular characterization and confocal laser scanning microscopic study of *Pygidiopsis macrostomum* (Trematoda: Heterophyidae) parasites of guppies *Poecilia vivipara*. *Journal of Fishes Diseases* 40: 191-203.

Born-Torrijos A, Holzer AS, Raga JA, Van Beest GS & Yoneva A 2017. Description of embryonic development and ultrastructure in miracidia of *Cardiocephaloides longicollis* (Digenea, Strigeidae) in relation to active host finding strategy in a marine environment. *Journal of Morphology* 278: 1137-1148

Boutin-Ganache I, Raposo M, Raymond M & Deschepper CF 2001. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques* 31: 24-26.

Brandão M, Luque JL, Scholz T & Kostadinova A 2013. New records and descriptions of digeneans from the Magellanic penguin *Spheniscus magellanicus* (Forster) (Aves: Sphenisciformes) on the coast of Brazil. *Systematic Parasitology* 85: 79-98.

Brant SV, Morgan JA, Mkoji GM, Snyder SD, Rajapakse RP & Loker ES 2006. An approach to revealing blood fluke life cycles, taxonomy, and diversity: provision of key reference data including DNA sequence from single life cycle stages. *Journal of Parasitology* 92: 77-88.

Brown WM, George M & Wilson AC 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 1967-1971.

Caballero E & Díaz-Ungría C 1958. Intento de un catálogo de los tremátodos digéneos registrados en territorio venezolano. *Memoria de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle* 18: 19-36.

Cable RM 1956. Marine cercariae of Puerto Rico. *Scientific Survey of Porto Rico and the Virgin Islands* 16(4): 491-577.

Cable RM 1963. Marine cercariae from Curaçao and Jamaica. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 23(5): 429-469.

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: 884-891.

Carvalho GA, Ueta MT & Andrade CFS 2001. Búsqueda de xifidiocercarias (Trematoda) en moluscos de agua dulce recolectados en nueve municipios del Estado de São Paulo Brasil. *Boletín Chileno de Parasitología* 56: 3-9.

Ciurea I. 1930. Contributions à l'étude morphologique et biologique de quelques Strigéidés des oiseaux ichthyophages de la faune de Roumanie (Recherches experimentales). *Archives Roumaines de Pathologie Expérimentales et de Microbiologie* 3: 277-323.

Cohen SC, Fernandes BMM, Gibson D, Bray RA, Pinto HA, Campião KM & Justo M 2016. Strigeidae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/1192>>. Acesso em: 05 Dez. 2016.

Coletto FA, Cambraia DJ, Silveira EP & Machado MI 1993. Sobre criadouros urbanos de *Biomphalaria straminea* na cidade de Uberlândia, Minas Gerais. *Revista Centenária de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia* 9: 35-45.

Combes C & Nassi H 1977. Metacercarial dispersion and intracellular parasitism in a strigeid trematode. *International Journal of Parasitology* 7: 501-503.

Combes C, Bartoli P & Théron A 2002. Trematode transmission strategies. In: *The Behavioural Ecology of Parasites* (EE Lewis, JF Campbell & MVK Sukhdeo, eds), pp. 1-12. CAB International, Wallingford, UK.

Corrêa LL, Souza GT, Takemoto RM, Ceccarelli PS & Adriano, EA 2014. Behavioral changes caused by *Austrodiplostomum* spp. in *Hoplias malabaricus* from the São Francisco River, Brazil. *Parasitology Research* 113: 499-503.

Cremonte F, Gilardoni C, Pina S, Rodrigues P & Ituarte C 2015. Revision of the family Gymnophallidae Odhner, 1905 (Digenea) based on morphological and molecular data. *Parasitology International* 64: 202-210.

Cribb TH, Bray RA & Littlewood DTJ 2001. The nature and evolution of the association among digeneans, molluscs and fishes. *International Journal of Parasitology* 31: 997-1011.

Davies D & Ostrowski de Núñez M 2012. The life cycle of *Australapatemon magnacetabulum* (Digenea: Strigeidae) from northwestern Argentina. *Journal of Parasitology* 98: 778-783.

Davies D, Davies C, Lauthier J, Hamann M & Ostrowski de Núñez M 2015. Morphological and ITS2 molecular characterization of *Ribeiroia* cercariae (Digenea: Psilostomidae) from *Biomphalaria* spp. (Gastropoda: Planorbidae) in Northern Argentina. *Journal of Parasitology* 101: 549-555.

Dawes B 1968. The Trematoda: with special reference to British and other European forms. Cambridge University Press, London. 644 p.

Dias MLGG, Eiras JC, Machado MH, Souza GTR, & Pavanelli GC 2002. Cercariae infection in Planorbidae molluscs from the floodplain of the high Paraná river, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo* 69: 27-31.

Digiani MC 2000. Digeneans and cestodes parasitic in the white-faced ibis *Plegadis chihi* (Aves: Threskiornithidae) from Argentina. *Folia Parasitologica* 47: 195-204.

Drago FB & Lunaschi LI 2011. Digéneos parásitos de aves Ciconiiformes de Argentina. *Revista mexicana de Biodiversidad* 82: 77-83.

Dronen NO 2009. *Austrodiplostomum ostrowskiae* n. sp. (Digenea: Diplostomidae: Diplostominae) from the double-crested cormorant, *Phalacrocorax auritus* (Phalacrocoracidae) from the Galveston, Texas area of the Gulf of Mexico, USA. *Comparative Parasitology* 76: 34-39.

Dubois G 1937. Sur quelques strigeides (Notes préliminaires). *Revue Suisse De Zoologie* 44: 391-396.

Dubois G 1938. Monographies des Strigeida (Trematoda). *Memories de la Société des Sciences Naturelles* 6: 1-535.

Dubois G 1953. Systematique des Strigeida. Complement de la Monographie. *Memories de la Société des Sciences Naturelles* 8: 1-141.

Dubois G 1960. Contribution à l'étude des trématodes de chiroptères. Révision du sous-genre *Prosthodendrium* Dollfus, 1931 et des genres *Lecithodendrium* Looss, 1896 et *Pycnporus* Looss 1899. *Revue Suisse de Zoologie* 67: 1-80.

Dubois G 1968. Synopsis des Strigeidae et des Diplostomatidae (Trematoda). *Bulletin de la Société de Science Naturelle de Neuchâtel* 10: 1-258.

Dubois G 1970a. Les Strigeata (Trematoda) de la collection A. Lutz. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 68: 169-196.

Dubois G 1970b. Synopsis des Strigeidae et des Diplostomatidae (Trematoda). *Memories de la Société des Sciences Naturelles* 10: 259-727.

Dzikowski R, Levy MG, Poore MF, Flowers JR & Paperna I 2004. *Clinostomum complanatum* and *Clinostomum marginatum* (Rudolphi, 1819) (Digenea: Clinostomidae) are separate species based on differences in ribosomal DNA. *Journal of Parasitology* 90: 413-414.

Eduardo JM, Takahashi FY, Holcman MM, Costa CBTL & Ohlweiler FP 2012. Gastrópodes dulciaquícolos e helmintos associados, em coleções hídricas de Santo André, São Paulo, Brasil. *Revista de Biociências* 18: 22-34.

Eiras JC 1994. Elementos de ictioparasitologia. Fundação Eng. António de Almeida, Porto, 339p.

Espíndola KS, Machado MM & Hofmann PRP 1992. Natural and experimental infection of planorbids from the island of Santa Catarina (Brazil). *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo* 34: 289-294.

Faltýnková A, Niewiadomska K, Santos MJ & Valtonen ET 2007. Furcocercous cercariae (Trematoda) from freshwater snails in Central Finland. *Acta Parasitologica* 52: 310-317.

Faltýnková A, Georgieva S, Kostadinova A, Costa I, Scholz T & Skírnisson K 2014. *Diplostomum* von Nordmann, 1832 (Digenea: Diplostomidae) in the sub-Arctic: descriptions of the larval stages of six species discovered recently in Iceland. *Systematic Parasitology* 89: 195-213.

Faust EC & Huffman W 1934. Studies on Schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. III. Biological studies. I. The-extra-mammalian phases of the life cycle. *Puerto Rico Journal Public Health and Tropical Medicine* 10: 1-47.

Felsenstein J 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368-376.

Fernandes BMM, Justo CN, Cárdenas MQ & Cohen SC 2015. South American trematodes parasites of birds and mammals. FIOCRUZ – RJ. Rio de Janeiro. 516 pp.

Fernandes BJ, Cooper JD, Cullen JB, Freeman RS, Ritchie AC, Scott AA & Stuart PF 1976. Systemic infection with *Alaria americana* (Trematoda). *Canadian Medical Association Journal* 115: 1111-1114.

Fernandes BMM & Kohn A 2014. South American trematodes parasites of amphibians and reptiles. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 225p.

Fernández MV, Hamann MI & Ostrowski de Núñez M 2016. New larval trematodes in *Biomphalaria* species (Planorbidae) from Northeastern Argentina. *Acta Parasitologica* 61: 471-492.

Fernández MV & Hamann, M I 2017. Cercariae (Digenea: Strigeidae, Diplostomidae) in *Biomphalaria straminea* (Planorbidae) from a rice field in Northeastern Argentina. *Revista de Biología Tropical* 65: 551-563.

Fernández MV, Hamann MI & Ostrowski de Núñez M 2013. Larval trematodes from *Biomphalaria straminea* (Mollusca, Planorbidae) in a rice field in Corrientes Province, Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 756-764.

Figueira GF, Oliveira VH, Taroda A, Alfieri AA & Headley AS 2014. Molecular characterization of *Eurytrema coelomaticum* in cattle from Paraná, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* 23: 383-386.

Flores VR & Semenas LG 2008. Larval digenean community parasitizing the freshwater snail, *Chilina dombeyana* (Pulmonata: Chiliniidae) in Patagonia, Argentina, with special reference to the notocotylid *Catatropis chilinae*. *Journal of Parasitology* 94: 305-313.

Flowers JR, Poore MF, Mullen JE & Levy MG 2004. Digeneans collected from piscivorous birds in North Carolina, USA. *Comparative Parasitology* 71: 243-244.

Freeman RS, Stuart PF, Cullen JB, Ritchie AC, Mildon A, Fernandes BJ & Bonin A 1976. Fatal human infection with mesocercariae of the trematode *Alaria americana*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 25: 803-807.

Fried B, Barber LW & Butler MS 1978. Growth and development of the *Tetracotyle* of *Cotylurus strigeoides* (Trematoda) in the chick, on the chorioallantois and in vitro. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 45: 162-166.

Galaktionov KV & Dobrovolskij AA 2003. The biology and evolution of trematodes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 592 pp.

Galaviz-Silva L, Molina-Garza ZJ, Escobar González B & Iruegas-Buentello FJ 2013. Metazoan parasites of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) from three dams in Nuevo Leon, Mexico. *Hidrobiológica* 23: 394-398.

Galazzo DE, Dayanandan S, Marcogliese DJ & McLaughlin JD 2002. Molecular systematics of some North American species of *Diplostomum* (Digenea) based on

rDNA-sequence data and comparisons with European congeners. *Canadian Journal of Zoology* 80: 2207-2217.

García-Varela M, Sereno-Uribe AL, Pinacho-Pinacho CD, Domínguez-Domínguez O & Perez-Ponce de León G 2016. Molecular and morphological characterization of *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen, 2009 (Digenea: Diplostomatidae), a parasite of cormorants in the Americas. *Journal of Helminthology* 90: 174-185.

García-Varela M, Sereno-Uribe AL, Pinacho-Pinacho CD, Hernández-Cruz E & Perez-Ponce G 2015. An integrative taxonomic study reveals a new species of *Tylodelphys* Diesing, 1950 (Digenea: Diplostomidae) in central and northern Mexico. *Journal of Helminthology* 90: 668-679.

Gardner S & Campbell M 1992. Parasites as probes for biodiversity. *Faculty Publications from the Harold W. Manter Laboratory of Parasitology* 26: 596-600.

Georgieva S, Selbach C, Faltýnková A, Soldánová M, Sures B, Skírnisson K & Kostadinova A 2013. New cryptic species of the 'revolutum' group of *Echinostoma* (Digenea: Echinostomatidae) revealed by molecular and morphological data. *Parasites & Vectors* 6: 64.

Gibson DI, Jones A & Bray RA 2002. Keys to the Trematoda. Vol. 1. CAB International, London. 521 pp.

Gordy MA, Locke SA, Rawlings TA, Lapierre AR & Hanington P 2017. Molecular and morphological evidence for nine species in North American *Australapatemon* (Sudarikov, 1959): a phylogeny expansion with description of the zygoercous *Australapatemon mclaughlini* n. sp. *Parasitology Research* 116: 2181-2198.

Grault CE, Mello-Silva CCC, Costa MJFS, Lenzi MF, Cruz OJ, Almeida AS, Silva MQ, Bezerra RMP & Costa V 1998. Potential spread of schistosomiasis in the periphery of greater metropolitan region of Rio de Janeiro. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 93(Suppl 1): 293- 294.

Gressler LT, Noll JCG, Freitas, ÍBD & Monteiro SG 2016. Multiparasitism in a wild cat (*Leopardus colocolo*) (Carnivora: Felidae) in southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* 25: 374-377.

Hebert PD, Ratnasingham S & Waard JR 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270 (Suppl 1): S96-S99.

Hendrickson GL 1986. Observations on the life cycle of *Ornitodiplostomum ptychocheilus* (Trematoda: Diplostomatidae). *Proceedings of the Helminth Society of Washington* 53: 166-172.

Hernández-Mena DI, 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.

Hillis DM & Davis SK 1986. Evolution of ribosomal DNA: fifty million years of recorded history in the frog genus *Rana*. *Evolution* 40: 1275-1288.

Hong ST, Chai JY & Lee SH 1986. Ten human cases of *Fibricola seoulensis* infection and mixed one with *Stellantchasmus* and *Metagonimus*. *Korean Journal of Parasitology* 24: 94-96.

Hong ST, Cho TK, Hong SI, Chai JV, Lee SH & Seo BS 1984. Fifteen cases of *Fibricola seoulensis* infection in Korea. *Korean Journal of Parasitology* 22: 61-65.

Hughins EJ 1954a. Life history of a strigeid trematode, *Hysteromorpha triloba* (Rudolphi, 1819) Lutz, 1931. I. Egg and miracidium. *Transactions of the American*

Microscopical Society 73: 1-15.

Hughins EJ 1954b. Life history of a strigeid trematode, *Hysteromorpha triloba* (Rudolphi, 1819) Lutz, 1931. II. Sporocyst through adult. *Transactions of the American Microscopical Society* 73: 221-236.

Hughes RC 1929. Studies on the trematode family Strigeidae (Holostomidae), No. XIV: Two new species of Diplostomula. *Occasional Papers of the Museum of Zoology Louisiana State University* 202: 1-34.

Illán G, de Blas I, & Ruíz-Zarzuela I 2016. *Hysteromorpha triloba*: primer registro de la presencia de la Enfermedad del Punto Negro en aguas continentales de Castilla y León (España). *Revista AquaTIC* 39: 36-43.

Iwagami M, Monroy C, Rosas MA, Agatsuma Y & Agatsuma T 2003. A molecular phylogeographic study based on DNA sequences from individual metacercariae of *Paragonimus mexicanus* from Guatemala and Ecuador. *Journal of Helminthology* 77: 33-38.

Jannotti-Passos LK, Magalhães KG, Carvalho OS & Vidigal THDA 2006. Multiplex PCR for both identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Gastropoda: Planorbidae) and diagnosis of infection by *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 92: 426-429.

Johnston TH 1942. Trematodes from Australian birds. I. Cormorants and darters. *Transactions of the Royal Society of South Australia* 66: 226-242.

Jousson O, Bartoli P, Zaninetti L & Pawlowski J 1998. Use of the ITS rDNA for elucidation of some life-cycles of Mesometridae (Trematoda, Digenea). *International Journal of Parasitology* 28: 1403-1411.

Karvonen A & Seppälä O 2008. Eye fluke infection and lens size reduction in fish: a quantitative analysis. *Diseases of Aquatic Organisms* 80: 21-26.

Kohn A, Fernandes BM & Baptista-Farias MD 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: 341-344.

Kumar S, Stecher G & Tamura K 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.

Lane RL & Morris JE 2000. Biology, prevention and effects of common grubs (digenetic trematodes) in freshwater fish. *US Dep Agric, Technical Bulletins* 115: 1-6.

Littlewood DTJ, Waeschenbach W & Nikolov PN 2008. In search of mitochondrial markers for resolving the phylogeny of cyclophyllidean tapeworms (Platyhelminthes Cestoda) a test study with Davaineidae. *Acta Parasitologica* 53: 133-144.

Locke SA, McLaughlin JD & 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, Al-Nasiri FS, Caffara M, Drago F, Kalbe M, Lapierre AR & Takemoto RM 2015. Diversity, specificity and speciation in larval Diplostomidae (Platyhelminthes: Digenea) in the eyes of freshwater fish, as revealed by DNA barcodes. *International Journal for Parasitology* 45: 841-855.

Locke SA, McLaughlin JD, Lapierre AR, Johnson PT & Marcogliese DJ 2011. Linking Larvae and Adults of *Apharyngostrigea cornu*, *Hysteromorpha triloba*, and *Alaria mustelae* (Diplostomoidea: Digenea) using molecular data. *Journal of Parasitology* 97: 846-851.

Lühe M 1909. Parasitische Plattwarmer. I: Trematodes. *Die Siisswasser-fauna Deutschlands. Heft Jena* 17: 1-217.

Lutz A 1921. Zur Kenntnis des Entwicklungszyklus der Holostomiden. *Zentralbl Bacteriol* 86: 124-129.

Lutz A 1928. Estudios sobre trematodes observados en Venezuela. *Estudios de zoología y parasitología venezolanas*, A. Lutz (ed.). Universidad Central de Venezuela, Caracas: 101-125.

Lutz A 1929. Nova contribuição para o conhecimento do ciclo evolutivo das Holostomídeas ou Strigeidas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 8: 128-130.

Lutz A 1931. Contribuição ao conhecimento da ontogenia das Strigeidas I. Ontogenia de *Hemistomum trilobum* (Rudolphi, 1819). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 25: 333-342.

Lutz A 1933. Notas sobre dicranocercarias brasileiras. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 27: 349-75.

Machado SMP, Cordeiro NS, Artigas PT & Magalhães LA 1987. Algumas considerações sobre cercárias naturalmente encontradas em *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835), capturadas em Louveira, SP. *Memorias do Instituto Butantan* 49: 79-86.

Magalhães KG, Passos LKJ & Carvalho ODS 2004. Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99(4): 421-424.

Martorelli SR, Alda P, Marcotegui P, La Sala LF & Montes MM 2013. Larval digeneans in *Biomphalaria* snails from the Salto Grande Dam area in the Uruguay River. *Publicación del Laboratorio de Helmintos y Parásitos de Crustáceos del CEPAVE*: 1-13.

Martorelli SR, Lino A, Marcotegui P, Montes MM, Alda P & Panei CJ 2012. Morphological and molecular identification of the fish-borne metacercaria of *Ascocotyle*

(*Phagicola*) *longa* Ransom, 1920 in *Mugil liza* from Argentina. *Veterinary Parasitology* 190: 599-603.

Mattos ACD, Boaventura MFF, Fernandez MA, & Thiengo SC 2013. Larval trematodes in freshwater gastropods from Mato Grosso, Brazil: diversity and host-parasites relationships. *Biota Neotropica* 13: 34-38.

Melo, AL 2008. Formas larvais de trematódeos encontradas em moluscos límnicos. In: Amaral RS, Thiengo SC, OS Pieri (eds.), *Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica: Diretrizes Técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)*, 2ª ed, Editora Ministério da Saúde, Brasília, p. 71-80.

Milward-de-Andrade R 1969. Nota ecológica sobre o lago da Pampulha (Belo Horizonte, MG). Com especial referência aos planorbídeos (Pulmonata, Planorbidae). *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 21: 59-116.

Möhl K, Große K, Hamedy A, Wüste T, Kabelitz P & Lücker E 2009. Biology of *Alaria* spp. and human exposition risk to *Alaria mesocercariaea*- review. *Parasitology Research* 105: 1-15.

Monteiro CM, Amato JF & Amato SB 2011. Helminth parasitism in the Neotropical cormorant, *Phalacrocorax brasilianus*, in Southern Brazil: effect of host size, weight, sex, and maturity state. *Parasitology Research* 109: 849-855.

Monteiro CM, Martins AN, Albuquerque MC, Clapp MDS, Duarte R, São Sabas, CS & Brasil-Sato MC 2017. *Austrodiplostomum compactum* Szidat & Nani (Digenea: Diplostomidae) in final and second intermediate hosts from upper São Francisco river in the State of Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine* 38(Supl. 3): 186-193.

Moraes J, Silva MPN, Ohlweiler FP & Kawano T 2009. *Schistosoma mansoni* and other larvae trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 51: 77-82.

Moszczyńska 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.

Muñoz G, López Z & Cardenas L 2012. Morphological and molecular analyses of larval trematodes in the intertidal bivalve *Perumytilus purpuratus* from central Chile. *Journal of Helminthology* 8: 356-363.

Nasir P 1964. Studies on freshwater larval trematodes. Part III. A new Species of a Strigeid Cercaria, *C. manzanarensis* from Venezuela. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 1: 30-33.

Nasir P 1979. Freshwater larval trematodes: *Cercaria ghaziaporzanae* n. sp., of the pharyngeal longifurcate distome group, parasitic in ancyloid molluscs. *International Journal for Parasitology* 9: 293-295.

Nasir P & Díaz MT 1973. Freshwater larval trematodes. XXXII. Twenty new species of Venezuelan cercariae. *Rivista di Parasitologia* 1: 1-44.

Nasir P & Guevara S 1968. Studies on freshwater larval trematodes. Part XXII. Two new species of Venezuelan cercariae. *Rivista di Parasitologia* 4: 247-251.

Nasir P, Acuna CA & Guevara CS 1966. Studies on freshwater Larval Trematodes. Part XII. Two new Species of cercariae infecting *Pachychilus laevis* sowerby in Venezuela. *Sonderdruck aus, Zoologischer Anzeiger* 2(177):133-138.

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: 87-90.

Nasir P, Hamana SLJ & Díaz MT 1969. Studies on freshwater larval trematodes. XXIII. Additional five new species of Venezuelan cercariae. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 36: 231-239.

Nassir P 1983. Marine larval trematodes. VI. Cercariae criollisimae: Cercaria criollisima XI n. sp., a vivax larva from Venezuela. *Rivista di Parasitologia* 1(44): 71-75.

Nassi H 1987. Sur quatre furcocercaires émises par *Biomphalaria glabrata* en Guadeloupe. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 62: 17-35.

Nguyen TC, Li YC, Makouloutou P, Jimenez LA & Sato H 2012. *Posthodiplostomum* sp. metacercariae in the trunk muscle of Northern snakeheads (*Channa argus*) from the Fushinogawa River, Yamaguchi, Japan. *Journal of Veterinarian Medicine and Sciences* 74: 1367-1372.

Niewiadomska K 2002a. Family Diplostomidae Poirier, 1886. In: Gibson, D. I.; Jones, A.; Bray, R. A. (Ed.). Keys to the Trematoda Vol. 1. Wallingford: CABI Publishing, p. 167-196.

Niewiadomska K 2002b. Family Strigeidae Railliet, 1919; In D.I. Gibson, A. Jones and R.A. Bray (eds.). Keys to the Trematoda Vol. 1. Wallingford: CABI Publishing, p. 231-241.

Niewiadomska K 2003. Fish parasites of Poland (key to identification). Flatworms - Digenea. *Polish Parasitological Society*:169 p.

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.

Noronha D, Sá MR, Knoff M, Muniz-Pereira LC & Pinto RM 2009. Adolpho Lutz e a Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz,. Rio de Janeiro: Museu Nacional. 154 p.

O'Hear M, Pote L, Yost M, Doffitt C, King T & Panuska C 2014. Morphologic and molecular identifications of digenetic trematodes in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) from the Mississippi Delta, USA. *Journal of Wildlife Diseases*

50: 42-49.

Ohlweiler P, Eduardo JM, Takahashi FY, Crein GA, Re Luca L & Oliveira RC 2013. Larvas de trematódeos associadas a moluscos de água doce em municípios da Região Metropolitana de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 4: 37-48.

Ondračková M, Dávidová M, Gelnar M & Jurajda P 2006. Susceptibility of Prussian carp infected by metacercariae of *Posthodiplostomum cuticola* (v. Nordmann, 1832) to fish predation. *Ecological Research* 21: 526-529.

Ostrowski de Núñez, M 1968. Sobre el ciclo biológico de *Austrodiplostomum mordax* Szidat-Nani 1951. *Neotrópica* 14: 85-88.

Ostrowski de Núñez M 1970. Estudios sobre la fauna parasitaria del biguá, *Phalacrocorax b. brasiliensis*. II. Trematodes pertenecientes a la familia Diplostomatidae Poirier, 1886. *Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Zoología* 10: 199-214.

Ostrowski de Núñez M 1972. Fauna de agua dulce de la Republica Argentina. I. Anotaciones sobre furcocercarias. *Neotrópica* 18: 137-140.

Ostrowski de Núñez M 1973. Sobre el ciclo biológico de *Posthodiplostomum nanum* Dubois, 1937 (Trematoda, Diplostomatidae). *Physis* 32: 121-132.

Ostrowski de Núñez M 1977. El ciclo biológico de *Diplostomum (Austrodiplostomum) compactum* (Lutz, 1928) Dubois 1970 (= *Austrodiplostomum mordax* Szidat y Nani 1951) (Trematoda, Diplostomatidae). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Parasitología* 2: 7-63.

Ostrowski de Núñez M 1982. Die Entwicklungszyklen von *Diplostomum (Austrodiplostomum) compactum* (Lutz, 1928) und *D. (A.) mordax* (Szidat und Nani, 1951) n. comb in Südamerika. *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 1992. Trematoda. Familias Strigeidae, Diplostomidae, Schistosomatidae, Spirorchiidae y Bucephalidae. *Fauna de Agua Dulce de la República Argentina. PROFADU (CONICET), Buenos Aires* 9: 1-55.

Ostrowski de Núñez M 2017. Redescription of *Austrodiplostomum compactum* (Trematoda: Diplostomidae) from its type host and locality in Venezuela, and of *Austrodiplostomum mordax* from Argentina. *Journal of Parasitology* 103: 497-505.

Ostrowski de Núñez M & Quaggiotto A 1995. Larval trematodes (Digenea) of Diplostomidae, Strigeidae and Echinostomatidae families in the Patagonian Region in Argentina. *Boletín Chileno de Parasitología* 50: 28-33.

Ostrowski de Núñez M, Hamann MI, Rumi A 1990. Larval trematodes of *Schistosoma mansoni*-transmitting snails, *Biomphalaria* spp. in northeast Argentina. *Acta Parasitologica Polonica* 35: 85-96.

Ostrowski de Núñez M, Hamann MI & Rumi A 1991. Population dynamics of planorbid snails from a lentic biotope in Northeastern Argentina. Larval trematodes of *Biomphalaria occidentalis* and analysis of their prevalence and seasonality. *Acta Parasitologica Polonica* 36: 159- 166.

Ostrowski de Núñez M, Hamann MI & Rumi A 1997. Estudios de trematodes larvales en *Biomphalaria* spp. (Mollusca, Planorbidae) de la localidad de San Roque, provincia de Corrientes, Argentina. *Physis* 54: 7-15.

Overstreet RM & Curran SS 2004. Defeating diplostomoid dangers in USA catfish aquaculture. *Folia Parasitologica* 51: 153-165.

Overstreet RM, Curran SS, Pote LM, King DT, Blend CK & Grater WD 2002. *Bolbophurus damnificus* n. sp. (Digenea: Bolbophoridae) from the channel catfish

Ictalurus punctatus and American white pelican *Pelecanus erythrorhynchos* in the USA based on life-cycle and molecular data. *Systematic Parasitology* 52: 81-96.

Palmieri JR 1977. Host-induced morphological variations in the strigeoid trematode *Posthodiplostomum minimum* (Trematoda: Diplostomatidae). IV. Organs of reproduction (ovary and testes), vitelline gland, and egg. *Great Basin Naturalist* 37: 481-488.

Paraense WL 1975. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arquivos do Museu Nacional* 55: 105-128.

Pérez-del Olmo A, Georgieva S, Pula HJ & Kostadinova A 2014. Molecular and morphological evidence for three species of *Diplostomum* (Digenea: Diplostomidae), parasites of fishes and fish-eating birds in Spain. *Parasites & Vectors* 7: 502-516.

Pérez-Ponce de León G 1995. Host-induced morphological variability in adult *Posthodiplostomum minimum* (Digenea: Neodiplostomidae). *Journal of Parasitology* 85: 818-820.

Pérez-Ponce de León G & García-Prieto L 2001. Los parásitos en el contexto de la biodiversidad y la conservación. CONABIO. *Biodiversitas* 34:11-15

Pérez-Vigueras I 1944. Trematodes de la super-familia Strigeoidea; descripción de un género y siete especies nuevas. *Revista de la Universidad de la Habana* 52-54: 294-314.

Pinto HA & Melo AL 2012. Natural infection of *Poecilia reticulata* (Actinopterygii: Poeciliidae) by metacercariae at Pampulha reservoir, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca* 38: 257-264.

Pinto HA & Melo AL 2013a. Larvas de trematódeos em moluscos no Brasil: panorama e perspectivas após um século de estudos. *Revista de Patologia Tropical* 42: 369-386

Pinto HA & Melo AL 2013b. *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, Melo AL 2013c. A checklist of cercariae (Trematoda: Digenea) in molluscs from Brazil. *Zootaxa* 3666: 449-475.

Pinto HA, Mati VLT & Melo AL 2013d. New records and a checklist of trematodes from *Butorides striata* (Aves: Ardeidae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 1100-1110.

Pinto HA, Brant SV & Melo AL 2014. *Physa marmorata* (Mollusca: Physidae) as a natural intermediate host of *Trichobilharzia* (Trematoda: Schistosomatidae), a potential causative agent of avian cercarial dermatitis in Brazil. *Acta Tropica* 138: 38-43.

Pinto HA, Melo AL & Brant SV 2015a. 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, Caffara M, Fioravanti ML & Melo AL 2015b. Experimental and molecular study of cercariae of *Clinostomum* sp. (Trematoda: Clinostomidae) from *Biomphalaria* spp. (Mollusca: Planorbidae) in Brazil. *Journal of Parasitology* 101: 108-113.

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

Pirajá da Silva MA 1912. Cercaire brésilienne (*Cercaria blanchardi*) a queue bifurquée. *Archives of Parasitology* 15: 398-400.

Portier J, Jouet, D, Ferté H, Gibout, O, Heckmann A, Boireau P & Vallée I 2011. New data in France on the trematode *Alaria alata* (Goeze, 1792) obtained during *Trichinella* inspections. *Parasite* 18: 271-275.

Poulin R & Morand S 2004. Parasite biodiversity. Smithsonian Books. Washington, D.C. 216 p.

Pugachev ON 2003. Checklist of the freshwater fish parasites of the Northern Asia. Trematoda. *Proceedings of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences* 298: 224.

Ramos IP, Franceschini L, Zago AC, Zica ÉD, Wunderlich AC, Carvalho ED & Silva RJ 2013. New host records and a checklist of fishes infected with *Austrodiplostomum compactum* (Digenea: Diplostomidae) in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 22: 511-518.

Ritossa L, Flores VR & Viozzi G 2013. Life cycle of a *Posthodiplostomum* species (Digenea: Diplostomidae) in Patagonia, Argentina. *Journal of Parasitology* 99: 777-780.

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: 260-274.

Ruiz JM 1953. Contribuição ao estudo das formas larvárias de trematódeos brasileiros. Descrição de três furcocercárias que ocorrem em planorbídeos hospedeiros do *Schistosoma mansoni*. *Memórias do Instituto Butantan* 25: 77-89.

Seo BS, Lee SH, Hong ST, Hong SI, Kim CV & Lee HY 1982. Studies on intestinal trematodes in Korea. V. A human case infected by *Fibricola seoulensis* (Trematoda: Diplostomatidae). *Korean Journal of Parasitology* 20: 93-99.

Seppälä O, Karvonen, A & Valtonen ET 2004. Parasite-induced change in host behaviour and susceptibility to predation in an eye fluke–fish interaction. *Animal Behaviour* 68: 257-263.

Seppälä O, Karvonen A & Valtonen ET 2005. Manipulation of fish host by eye flukes in relation to cataract formation and parasite infectivity. *Animal Behaviour* 70: 889-894.

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.

Shoop WL & Corkum KC 1987. Maternal transmission by *Alaria marciana*e (Trematoda) and the concept of amphiparatenesis. *Journal of Parasitology* 73: 110-115.

Shoop WL & Corkum KC 1984. Transmammary infection of newborn by larval trematodes. *Science* 223:1082-1083.

Shoop WL, Font WF & Malatesta PF 1990. Transmammary transmission of mesocercariae of *Alaria marciana*e (Trematoda) in experimentally infected primates. *Journal of Parasitology* 76: 869-873.

Simone LRL 2006. *Land and Freshwater Molluscs of Brazil*. EGB/Fapesp, São Paulo, 390 p.

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.

Souza CP, Lima LC, Jannotti-Passos LK, Ferreira SS, Guimarães CT, Vieira IBF & Mariani Jr R 1998. Moluscos límnicos da microrregião de Belo Horizonte, MG, com ênfase nos vetores de parasitoses. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina*

Tropical 31: 449-456.

Souza CP, Pereira JP & Rodrigues MS 1981. Atual distribuição geográfica dos moluscos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* em Belo Horizonte, MG, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 76: 383-391.

Souza CP, Lima LC, Jannotti-Passos LK & Vieira IBF, Ferreira SS & Junior RM 1998. Moluscos límnicos da micro região de Belo Horizonte, MG, com ênfase nos vetores de parasitoses. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 31: 449-456.

Stoyanov B, Georgieva S, Pankov P, Kudlai O, Kostadinova A & Georgiev BB 2017. Morphology and molecules reveal the alien *Posthodiplostomum centrarchi* Hoffman, 1958 as the third species of *Posthodiplostomum* Dubois, 1936 (Digenea: Diplostomidae) in Europe. *Systematic Parasitology* 94: 1-20.

Takeuchi-Storm N, Al-Sabi MN, Thamsborg SM & Enemark HL 2015. *Alaria alata* mesocercariae among feral cats and badgers, Denmark. *Emerging Infectious Diseases* 21: 1872.

Tieszen JE, Johnson AD & Dickinson JP 1974. Structure and function of the holdfast organ and lappets of *Alaria mustelae* Bosma, 1931, with further studies on esterases of *A. marciana* (La Rue, 1917) (Trematoda: Diplostomatidae). *Journal of Parasitology* 60: 567-573.

Travassos L, Freitas JT & Kohn A 1969. Trematódeos do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 67: 1-886.

Uhrig EJ, Spagnoli ST, Tkach VV, Kent ML & Mason RT 2015. *Alaria mesocercariae* in the tails of red-sided garter snakes: evidence for parasite-mediated caudectomy. *Parasitology Research* 114: 4451-4461.

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.

Veitenheimer-Mendes IL 1981. Cercárias em *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Mollusca, Planorbidae) de Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Sér Zool* 60: 3-12.

Veitenheimer-Mendes IL 1982. Cercárias em moluscos planorbídeos de Camaquã, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 42: 545-551.

Veitenheimer-Mendes IL, Ohlweiler FP, Blum C 1995. Gastrópodes límnicos (Mollusca), hospedeiros intermediários de trematódeos (Platyhelminthes) em Porto Alegre e Viamão, Rio Grande do Sul. *Biociências* 3: 73-84.

Violante-González J, García-Varela M, Rojas-Herrera A & Guerrero SG 2009. Diplostomiasis in cultured and wild tilapia *Oreochromis niloticus* in Guerrero State, Mexico. *Parasitology Research* 105: 803-807.

Williams MO 1967. The *Neascus* stage of *Posthodiplostomum nanum* Dubois and an experimental determination of part of the life cycle. *Journal of Helminthology* 41: 269-276.

Wongsawad C, Wongsawad P, Sukontason K, Phalee A, Noikong-Phalee W, & Chai JY 2016. Discrimination 28S ribosomal gene of trematode cercariae in snails from Chiang Mai Province, Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 47: 199-206.

Yamaguti S 1939. Studies on the helminth fauna of Japan. 25. Trematodes of birds, IV. *Japanese Journal of Zoology* 8: 129-210.

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 Co., Tokyo. 590 p.