

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

DANIMAR DANILIA LÓPEZ HERNÁNDEZ

**CERCÁRIAS DAS SUPERFAMÍLIAS DIPLOSTOMOIDEA,  
ECHINOSTOMATOIDEA E PLAGIORCHIOIDEA EM MOLUSCOS DO  
BRASIL: NOVOS REGISTROS BASEADOS NA ABORDAGEM  
TAXONÔMICA INTEGRATIVA**

Belo Horizonte

Junho de 2022

DANIMAR DANILIA LÓPEZ HERNÁNDEZ

**CERCÁRIAS DAS SUPERFAMÍLIAS DIPLOSTOMOIDEA,  
ECHINOSTOMATOIDEA E PLAGIORCHIOIDEA EM MOLUSCOS DO  
BRASIL: NOVOS REGISTROS BASEADOS NA ABORDAGEM  
TAXONÔMICA INTEGRATIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Helminologia

Orientador: Dr. Hudson Alves Pinto

Belo Horizonte

Junho de 2022

043

Hernández, Danimar Danilia López.

Cercárias das superfamílias Diplostomoidea, Echinostomatoidea e Plagiorchioidea em moluscos do Brasil: novos registros baseados na abordagem taxonômica integrativa [manuscrito] / Danimar Danilia López Hernández. – 2022.

286 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Hudson Alves Pinto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Cercárias. 3. Moluscos. 4. Taxonomia. 5. Biomarcadores. I. Pinto, Hudson Alves. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

**"Cercárias das Superfamílias Diplostomoidea, Echinostomatoidea e Plagiorchioidea em Molusco do Brasil: Novos Registros Baseados na Abordagem Taxonômica Integrativa"**

ALUNA: DANIMAR DANILIA LÓPEZ HERNÁNDEZ

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **30 de junho de 2022**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

**Francisco Carlos Ferreira Júnior**

Smithsonian Conservation Biology, Institute, EUA

**Daniel Moreira de Avelar**

IRR/FIOCRUZ-MG

**Daniella Castanheira Bartholomeu**

UFMG

**Érika Martins Braga**

UFMG

**Hudson Alves Pinto** - Orientador

UFMG

Belo Horizonte, 30 de junho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Hudson Alves Pinto, Professor do Magistério Superior**, em 01/07/2022, às 14:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erika Martins Braga, Professora do Magistério Superior**, em 01/07/2022, às 22:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francisco Carlos Ferreira Junior, Usuário Externo**, em 04/07/2022, às 14:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Castanheira Bartholomeu, Professora do Magistério Superior**, em 04/07/2022, às 15:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1540147** e o código CRC **10B95785**.

Trabalho desenvolvido no Laboratório  
de Biologia de Trematoda,  
Departamento de Parasitologia,  
Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Minas  
Gerais.

*À minha avó Maria e minha tia Mildred*

## AGRADECIMENTOS

Sempre pensei que tudo o que fazemos e conseguimos na vida é graças ao apoio e carinho de um grupo de pessoas, que podem fazer parte do nosso dia a dia, ou estarem longe, mas vivem no nosso coração. Há também aquelas que aparecem de um momento a outro e nos oferecem uma ajuda incalculável, principalmente nestes últimos dois anos desafiadores. A todas essas pessoas, o meu sincero agradecimento a continuação,

Ao meu Orientador Hudson Alves Pinto. Agradeço por ter me orientado, mas, acredito que foi muito mais do que isso. Você foi um guia durante esta caminhada, um amigo nos momentos que precisei de um conselho e sempre me ensinou a aprender mais e ir um pouco mais longe. Também sou grata pela ajuda nos momentos difíceis. Obrigada por sua compreensão e por todas as oportunidades que me deu durante estes 6 anos.

Aos meus pais Danilo e Maria, meus irmãos Daniela, Williannys, Rodrigo, e meu amado sobrinho Luciano. Apesar destes mais de 4 anos distantes, vocês são e serão sempre a força que me faz me manter firme em todos os momentos. Por vocês, eu sou mais forte e corajosa. Agradeço por me acompanharem na distância neste caminho que tanto sonhei.

Ao meu esposo Arthur. Poderia dizer mil coisas para te agradecer e acho que nenhuma seria suficiente, pois tua companhia durante estes últimos 4 anos fez toda a diferença para mim. Em você encontrei meu lar neste país, um refúgio nos momentos complicados e o lugar perfeito para rir e ser feliz. Obrigada por sempre me impulsar a ser a melhor versão de mim mesma.

Aos meus amigos Guilherme Miranda, Williane Siqueira, Ana Carolina dos Santos, Diogo Tavares e Gustavo Rodrigues. Vocês fizeram da pós-graduação uma experiência linda e inesquecível. Obrigada por estarem presentes sempre que precisei de vocês e me acompanharem em momentos importantes da minha vida.

A minha querida amiga Maykelin Fuentes. Obrigada May, por estar comigo nos momentos mais difíceis, mesmo quando eu sabia que sua carga emocional era maior, você nunca me abandonou.

Aos meus amigos Jesus Arellano, Daniela Campos, Cristina Leal e Delta Regalado. Obrigada por serem o pedacinho da Venezuela em Belo Horizonte. Sem dúvidas, nossas conversas intelectuais, comidas típicas e danças fizeram estes 4 anos incríveis.

Ao professor Alan Lane de Melo. Agradeço pelos ensinamentos, dias de coletas, as conversas interessantes, e por sempre me ajudar quando precisei.

A Jordana Assis e Eduardo Pulido Murillo. Agradeço a companhia e ajuda nos primeiros anos de doutorado, os conselhos e conversas sobre parasitos. Com vocês aprendi muito.

A Phillipe Vieira Alves, pela ajuda e conselhos, que com certeza foram muito valiosos para este trabalho.

A Olivia Soares e Marisa Valadão, por todas as conversas, opiniões, risadas e conselhos. Obrigada por fazer cada ida ao laboratório mais amena.

Ao senhor Airton Lobo, por ter me ajudado sempre que precisei. Sou grata, também pela companhia, conversas e risadas.

Às senhoras Sumara Aparecida Guilherme e Sibebe das Graças Guilherme Abreu, secretárias Do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, ICB, UFMG. Agradeço a disposição e rapidez para solucionar tudo.

Às Dras. Monica Ammon Fernandez e Silvana Carvalho Thiengo, Laboratório de Malacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, pelo trabalho colaborativo e envio de parte das amostras incluídas no estudo.

Ao Dr. Sean Locke, University of Puerto Rico at Mayagüez, pela parceria em Diplostomoidea e troca de ideias para a análise dos resultados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, pelos conhecimentos oferecidos.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

A cada uma das pessoas que não mencionei, mas que foram um apoio incondicional nesta caminhada. Muito obrigada!

## RESUMO

Os trematódeos pertencentes às superfamílias Echinostomatoidea, Plagiorchioidea e Diplostomoidea, são, quando adultos, parasitos de tetrápodes. Estes helmintos possuem ciclos biológicos complexos, envolvendo moluscos gastrópodes como primeiros hospedeiros intermediários e diferentes espécies de invertebrados e vertebrados como segundos hospedeiros. Mais de 250 espécies de trematódeos destes três grandes grupos já foram registradas no Brasil infectando vertebrados, vários deles com importância médico-veterinária. Contudo, a maior parte dessas espécies não possui ciclo biológico e moluscos transmissores conhecidos. No presente estudo, larvas dos tipos, equinóstoma, xifidiocercária e estrigeocercária obtidas de moluscos coletados em coleções aquáticas do Brasil, foram submetidas a estudo morfológico e molecular. As amostras correspondem, em parte, a larvas previamente coletadas de localidades dos estados de Minas Gerais, Maranhão e Rio de Janeiro entre 2013 e 2019 (35 amostras). Além disso, foram também avaliadas larvas obtidas durante coletas malacológicas realizadas em localidades de Minas Gerais, entre 2018 e 2019. Neste caso, 1706 exemplares de moluscos gastrópodes de 11 espécies foram examinados e 95 apresentavam-se infectados por larvas das superfamílias de interesse (11 amostras). As larvas obtidas foram submetidas a estudo morfológico e morfométrico em microscópio óptico e comparadas com larvas semelhantes reportadas no Brasil e em outras localidades do mundo. O estudo molecular resultou em 67 sequências nucleotídicas de genes nucleares (28S e ITS1-5.8S-ITS2) e mitocondriais (*Cox-1* e *Nad-1*). Estas foram comparadas com sequências disponíveis no GenBank e utilizadas em análises filogenéticas (Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana). A maior parte das amostras avaliadas correspondem a larvas da superfamília Echinostomatoidea, sendo 12 espécies de 2 famílias identificadas. A família Echinostomatidae, foi representada por 11 espécies incluindo *Drepanocephalus spathans*, *Neopetasiger* sp., Echinostomatidae sp. 1, Echinostomatidae sp. 3, Echinostomatidae sp. 4, Echinostomatidae sp. 5, *Rhopalias* sp. 1, *Rhopalias* sp. 2, *Rhopalias* sp. 3 e *Ribeiroia* sp. encontradas em moluscos planorbídeos (*Biomphalaria* spp., *Drepanotrema lucidum* e *Gundlachia ticaga*), além de Echinostomatidae sp. 2 encontrada em *Pomacea* sp. Uma espécie identificada em nível de família, Echinochasmidae gen. sp., foi verificada em *Pomacea* spp. Entre os principais achados destaca-se a demonstração de que Echinostomatidae sp. 1, larva comum em *Biomphalaria* spp. e previamente associada a *Paryphostomum segregatum*, parasito de aves não se

agrupou com nenhum dos gêneros da superfamília com dados disponíveis, nem tão pouco com *P. radiatum*, espécie-tipo do gênero. Adicionalmente, larvas do tipo magnacauda com colar cefálico com 19 espinhos foram associadas ao gênero *Neopetasiger*, que inclui espécies encontradas em aves. Além disso o ciclo biológico de espécies do gênero *Rhopalias*, parasitos de marsupiais, foi demonstrado pela primeira vez a partir do estudo de *Cercaria macrogranulosa*. Na superfamília Plagiorchioidea, 5 amostras de xifidiocercárias foram estudadas, incluindo larvas amplamente reportadas em *Biomphalaria* spp. no Brasil, *Cercaria minense*, *Cercaria lutzi*, e *Cercaria santense*, as quais foram identificadas como *Magnivitellinum* sp. (parasito de peixes), *Haematoloechidae* gen. sp. (parasito de anfíbios), *Plagiorchioidea* gen. sp., respectivamente. Além dessas, registra-se pela primeira vez a ocorrência de cercárias do parasito de serpentes *Renifer* sp. em *Stenophysa marmorata* na América do Sul. Larvas de um provável parasito pulmonar de anfíbios, *Haematoloechus* sp. foram encontradas em *Pseudosuccinea columella*. Na superfamília Diplostomoidea, adicionou-se informações inéditas para 3 espécies encontradas no país. Uma destas, emergida de *Biomphalaria straminea*, foi identificada como *Apharyngostrigea pipientis*. Esta é uma espécie que parasita ardeídeos e os resultados obtidos contribuíram para caracterizar a sua distribuição inter-continental. Finalmente, duas espécies da família Diplostomidae, são também relatadas. Uma delas, associada à “doença dos pontos pretos” em peixes, foi identificada como *Crassiphiala* sp. que utiliza *B. straminea* e peixes ornamentais, *Etiopplus maculatus*, como hospedeiros intermediários. Uma outra larva, foi identificada como *Diplostomidae* gen. sp., não apresentando similaridade morfológica nem molecular com nenhuma das larvas e sequências disponíveis para comparação. Os resultados aqui apresentados revelaram uma variedade de novas interações biológicas entre moluscos e larvas de trematódeos no Brasil. Por outro lado, a geração de sequências referências (baseadas em adultos) para a fauna de trematódeos neotropicais se demonstra como primordial para o avanço na identificação de cercárias encontradas em moluscos.

Palavras-chave: cercárias, Diplostomoidea, Echinostomatoidea, Plagiorchioidea, moluscos, sequências, taxonomia integrativa, marcadores moleculares.

## ABSTRACT

Trematodes belonging to the superfamilies Echinostomatoidea, Plagiorchioidea and Diplostomoidea are, as adults, parasites of tetrapods. These helminths have complex biological cycles, involving gastropod mollusks and different invertebrates as first intermediate hosts and vertebrate species as secondary hosts. More than 250 trematodes species of these three large groups have been recorded infecting Brazilian vertebrates, several of them with medical-veterinarian importance. However, in most of these species, the biological cycle and the mollusk transmitters are unknown. In the present study, larvae of echinocercariae, xyphidiocercariae and strigeocercariae types, obtained from mollusks collected in water bodies in Brazil, were subjected to morphological and molecular studies. The samples correspond, in part, to previously collected larvae in localities from the states of Minas Gerais, Maranhão and Rio de Janeiro between 2013 and 2019 (35 samples). In addition, obtained larvae during malacological collections carried out in localities of Minas Gerais between 2018 and 2019 were also evaluated. In this case, 1706 gastropod mollusk specimens of 11 species were examined and 95 were infected by larvae of the superfamilies of interest (11 samples). The obtained larvae were subjected to morphological and morphometric studies under optic microscope and compared with similar larvae reported in Brazil and other parts of the world. Molecular study resulted in 67 nucleotide sequences of nuclear (28S and ITS1-5.8S-ITS2) and mitochondrial (*Cox-1* and *Nad-1*) genes. These were compared with sequences available in GenBank and used in phylogenetic analyses (Maximum Likelihood and Bayesian Inference). Most of evaluated samples correspond to larvae of the superfamily Echinostomatoidea, identifying 12 species from 2 families. The Echinostomatidae family was represented by 11 species including *Drepanocephalus spathans*, *Neopetasiger* sp., Echinostomatidae sp. 1, Echinostomatidae sp. 3, Echinostomatidae sp. 4, Echinostomatidae sp. 5, *Rhopalias* sp. 1, *Rhopalias* sp. 2, *Rhopalias* sp. 3 and *Ribeiroia* sp. founded in planorbid mollusks (*Biomphalaria* spp., *Drepanotrema lucidum* and *Gundlachia ticaga*), as well as Echinostomatidae sp. 2 found in *Pomacea* sp. One species was identified to family level, Echinochasmidae gen. sp., was verified in *Pomacea* spp. Also, magnacauda-like larvae with cephalic collar with 19 spines were associated with the genus *Neopetasiger*, which includes species found in birds. On the other hand, biological cycle of species of the genus *Rhopalias*, marsupial parasites, was demonstrated for the first time, based on the study of *Cercaria macrogranulosa*. In the superfamily Plagiorchioidea, 5 samples of

xyphidiocercariae were studied, including larvae widely reported in *Biomphalaria* spp. in Brazil, *Cercaria minense*, *Cercaria lutzi* and *Cercaria santense*, which were identified as *Magnivittellinum* sp. (fish parasite), Haematoloechidae gen. sp. (amphibian parasite), Plagiorchioidea gen. sp., respectively. In addition to these, the presence of cercariae of the snake parasite *Renifer* sp. in *Stenophysa marmorata* is recorded for the first time in South America. Larvae of a probable amphibian lung parasite, *Haematoloechus* sp. were found in *Pseudosuccinea columella*. In the superfamily Diplostomoidea new information was added for 3 species found for the country. One of these, derived from *Biomphalaria straminea*, was identified as *Apharyngostrigea pipientis*. This is a species that parasitizes ardeids and the obtained results contributed to characterize its intercontinental distribution. Finally, two species of the family Diplostomidae are also reported. One of them, associated with "black spot disease" in fish, was identified as *Crassiphiala* sp. using *B. straminea* and ornamental fish, *Etroplus maculatus*, as intermediate hosts. Another larva was identified as Diplostomidae gen. sp., showing no morphological or molecular similarity to any of the larvae and sequences available for comparison. The results presented here revealed a variety of new biological interactions between mollusks and trematode larvae in Brazil. On the other hand, the generation of reference sequences (based on adults) for the Neotropical trematode fauna is essential to advance in cercariae identification found in mollusks.

Keywords: cercariae, Diplostomoidea, Echinostomatoidea, Plagiorchioidea, snails, sequences, integrative taxonomy, molecular markers.

## RESUMEN

Los trematodos pertenecientes a las superfamilias Echinostomatoidea, Plagiorchioidea y Diplostomoidea son, cuando adultos, parásitos de tetrápodos. Estos helmintos tienen ciclos biológicos complejos, involucrando moluscos gasterópodos como primeros hospederos intermediarios y diferentes especies de invertebrados y vertebrados como segundos hospederos. Más de 250 especies de trematodos de estos tres grandes grupos ya fueron registradas en Brasil infectando vertebrados, varias de ellas con importancia médico-veterinaria. Sin embargo, en la mayoría de estas especies el ciclo biológico y los moluscos transmisores son desconocidos. En el presente estudio, larvas de los tipos equinocercaria, xifidiocercaria y estrigeocercaria, obtenidas de moluscos colectados en colecciones acuáticas en Brasil fueron sometidas a estudios morfológicos y moleculares. Las muestras corresponden, en parte, a larvas recolectadas previamente en localidades de los estados de Minas Gerais, Maranhão y Rio de Janeiro entre 2013 y 2019 (35 muestras). Además, también se evaluaron larvas obtenidas durante colectas malacológicas realizadas en localidades de Minas Gerais entre 2018 y 2019. En este caso, se examinaron 1706 especímenes de moluscos gasterópodos de 11 especies y 95 fueron infectados por larvas de las superfamilias de interés (11 muestras). Las larvas obtenidas fueron sometidas a estudio morfológico y morfométrico bajo microscopio óptico y comparadas con larvas similares reportadas en Brasil y en otras partes del mundo. El estudio molecular dio como resultado 67 secuencias de nucleótidos de genes nucleares (28S e ITS1-5.8S-ITS2) y mitocondriales (*Cox-1* y *Nad-1*). Estos se compararon con secuencias disponibles en GenBank y se usaron en análisis filogenéticos (Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana). La mayoría de las muestras evaluadas corresponden a larvas de la superfamilia Echinostomatoidea, identificándose 12 especies de 2 familias. La familia Echinostomatidae estuvo representada por 11 especies incluyendo *Drepanocephalus spathans*, *Neopetasiger* sp., Echinostomatidae sp. 1, Echinostomatidae sp. 3, Echinostomatidae sp. 4, Echinostomatidae sp. 5, *Rhopalias* sp. 1, *Rhopalias* sp. 2, *Rhopalias* sp. 3 y *Ribeiroia* sp. encontrada en moluscos planorbídeos (*Biomphalaria* spp., *Drepanotrema lucidum* y *Gundlachia ticaga*), además de Echinostomatidae sp. 2 encontrado en *Pomacea* sp. Una especie identificada a nivel de familia, Echinochasmidae gen. sp., se verificó en *Pomacea* spp. Entre los principales hallazgos, la demostración de que Echinostomatidae sp. 1, larva común en *Biomphalaria* spp. y previamente asociado con *Paryphostomum segregatum*, un parásito de aves que no

se agrupó con ninguno de los géneros de la superfamilia con datos disponibles, ni con *P. radiatum*, la especie tipo del género. También, larvas de tipo magnacauda con collar cefálico con 19 espinas se asociaron con el género *Neopetasiger*, que incluye especies que se encuentran en las aves. Por otro lado, se demostró por primera vez el ciclo biológico de especies del género *Rhopalias*, parásitos de marsupiales, a partir del estudio de *Cercaria macrogranulosa*. En la superfamilia Plagiorchioidea, se estudiaron 5 muestras de xifidiocercarias, incluyendo larvas ampliamente reportadas en *Biomphalaria* spp. en Brasil, *Cercaria minense*, *Cercaria lutzi* y *Cercaria santense*, que fueron identificadas como *Magnivitellinum* sp. (parásito de los peces), Haematoloechidae gen. sp. (parásito de anfibios), Plagiorchioidea gen. sp., respectivamente. Además de estos, se registra por primera vez la presencia de cercarias del parásito de serpientes *Renifer* sp. en *Stenophysa marmorata* en América del Sur. Larvas de un probable parásito pulmonar de anfibios, *Haematoloechus* sp. fueron encontradas en *Pseudosuccinea columella*. En la superfamilia Diplostomoidea se agregó nueva información para 3 especies encontradas en el país. Uno de estos, surgido de *Biomphalaria straminea*, fue identificado como *Apharyngostrigea pipientis*. Esta es una especie que parasita ardeídeos y los resultados obtenidos contribuyeron a caracterizar su distribución intercontinental. Finalmente, también se reportan dos especies de la familia Diplostomidae. Uno de ellos, asociado a la “enfermedad de los puntos negros” en peces, fue identificado como *Crassiphiala* sp. utiliza *B. straminea* y peces ornamentales, *Etroplus maculatus*, como hospederos intermediarios. Otra larva, fue identificada como Diplostomidae gen. sp., sin mostrar similitud morfológica ni molecular con ninguna de las larvas y secuencias disponibles para comparación. Los resultados presentados aquí revelaron una variedad de nuevas interacciones biológicas entre moluscos y larvas de tremátodos en Brasil. Por otro lado, la generación de secuencias de referencia (basadas en adultos) para la fauna de tremátodos neotropicales se muestra fundamental para avanzar en la identificación de cercarias encontradas en moluscos.

Palabras clave: cercarias, Diplostomoidea, Echinostomatoidea, Plagiorchioidea, moluscos, secuencias, taxonomía integrativa, marcadores moleculares.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Principais tipos cercarianos encontrados em moluscos (PINTO & MELO, 2013a).....	41
FIGURA 2- Esquema representativo do fluxo das análises morfológica e molecular das amostras de larvas de trematódeos avaliadas no presente estudo.....	55
FIGURA 3- Cercárias do tipo equinóstoma e gimnocéfala encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul.....	67
FIGURA 4- Cercárias do tipo equinóstoma e gimnocéfala encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul.....	68
FIGURA 5- Cercárias do tipo equinóstoma e gimnocéfala encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul.....	69
FIGURA 6- Cercárias do tipo equinóstoma e gimnocéfala encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul.....	70
FIGURA 7- Cercárias do tipo equinóstoma e gimnocéfala encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul.....	71
FIGURA 8- Echinochasmidae gen. sp.: (a) Cercária emergida de <i>P. maculata</i> naturalmente infectada corada por vermelho neutro (b) Cercária corada pelo Lugol. ...	75
FIGURA 9- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene 28S de cercárias identificadas como Echinochasmidae gen. sp. encontradas em <i>Pomacea maculata</i> no Brasil (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank.....	77

FIGURA 10- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região transcrita espaçadora interna ITS1 (a) e ITS2 (b) de cercárias identificadas como Echinochasmidae gen. sp. encontradas em *Pomacea maculata* no Brasil (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo K2+G (a, b)..... 78

FIGURA 11- *Drepanocephalus spathans*: (a) Cercária emergida de *Biomphalaria occidentalis* naturalmente infectada em Betim, Minas Gerais, Brasil (b) Detalhe do corpo..... 80

FIGURA 12-. *Neopetasisger* sp. (a) Cercária emergida de exemplares de *Biomphalaria occidentalis* encontradas em Contagem, Minas Gerais ..... 83

FIGURA 13- Echinostomatidae gen. sp. 1 (a) Cercária emergida de exemplares de *Biomphalaria occidentalis* naturalmente infectada em Betim, Minas Gerais (b) Detalhe do corpo da cercária mostrando os grânulos refringentes na base da ventosa oral. .... 87

FIGURA 14- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene 28S de cercárias identificadas como *Drepanocephalus spathans*, *Neopetasisger* sp. e Echinostomatidae gen. sp. 1 (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo TN93+G+I..... 89

FIGURA 15- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene mitocondrial *Nad-1* de cercárias identificadas como *Drepanocephalus spathans*, *Neopetasisger* sp. e Echinostomatidae gen. sp. 1 (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+G. .... 90

FIGURA 16-Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região transcrita interna 2 (ITS2) de cercárias identificadas como *Echinostomatidae* gen. sp. 1, no Brasil (em negrito) e outras espécies de *Echinostomatoidea* com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore foi inferida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando o modelo K2+G..... 91

FIGURA 17- *Echinostomatidae* gen. sp. 2. (a) Cercária emergida de exemplar de *Pomacea* sp. coletada em Januária, Minas Gerais. (b) Detalhe do corpo da cercária. (c) Detalhe da cauda..... 94

FIGURA 18- *Echinostomatidae* gen. sp. 3. (a) Cercária emergida de exemplar de *Biomphalaria straminea* coletada em Contagem, Minas Gerais. (b) Detalhe do corpo da cercária (c) Detalhe da cauda com membrana natatória. (d) Detalhe do colar de espinhos em lugol (e) Detalhe do órgão prefaringeal e glândulas de penetração entre a faringe e ventosa ventral em vermelho neutro..... 98

FIGURA 19- *Echinostomatidae* gen. sp. 4. (a) Cercária emergida de exemplar de *Biomphalaria glabrata* coletada em Januária, Minas Gerais. (b) Detalhe da cauda com membrana natatória. (c) Metacercária desencistada. (d) Detalhe do colar de espinhos. (e) Metacercária encistada encontrada em *B. glabrata*. ..... 102

FIGURA 20- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene 28S de cercárias identificadas como *Echinostomatidae* gen. sp. 2, *Echinostomatidae* gen. sp. 3 e *Echinostomatidae* gen. sp. 4 (em negrito) e outras espécies de *Echinostomatoidea* com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo TN93+G. .... 104

FIGURA 21- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene mitocondrial *Nad-1* de cercárias identificadas como *Echinostomatidae* gen. sp. 2, *Echinostomatidae* gen. sp. 3 e *Echinostomatidae* gen. sp. 4 (em negrito) e outras espécies de *Echinostomatoidea* com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo TN93+G+I. .... 105

FIGURA 22- Echinostomatidae gen. sp. 5. (a) Cercária emergida de exemplar de *Biomphalaria* sp. coletado no estado de Rio de Janeiro. (b) Detalhe do corpo da cercária. (c) Detalhe do órgão prefaringeal com espinhos. (d) Detalhe da cauda com membrana natatória. .... 107

FIGURA 23- *Rhopalias* sp. 1. (a) Cercária emergida de *B. glabrata* (b) Detalhe do corpo da larva emergida de *G. ticaga*. (c) Concreções circulares características de larvas deste gênero. (d) Metacercárias encontradas encistadas em girinos em uma das localidades de estudo..... 112

FIGURA 24- *Ribeiroia* sp. (a) Cercária emergida naturalmente de *Biomphalaria straminea*. (b) Detalhe do corpo cercariano em que se observa a presença de divertículos esofagianos. .... 116

FIGURA 25- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene 28S de cercárias identificadas como *Rhopalias* spp. e *Ribeiroia* sp. (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo GTR+G+I. .... 117

FIGURA 26- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região transcrita espaçadora interna: (a) ITS1-5.8S-ITS2 e (b) ITS2 de cercárias identificadas como *Rhopalias* spp. e *Ribeiroia* sp. (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo K2+G (a,b) ..... 118

FIGURA 27- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene mitocondrial *Nad-1* de cercárias identificadas como *Rhopalias* spp. (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo GTR+G+I. .... 119

FIGURA 28- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene citocromo c oxidase subunidade I <i>Cox-I</i> (região barcode) de cercárias identificadas como <i>Rhopalias</i> spp. (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+G+I.....	120
FIGURA 29- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene citocromo c oxidase subunidade I <i>Cox-I</i> (Região pós-barcode) de cercárias identificadas como <i>Ribeiroia</i> sp. (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+I.....	121
FIGURA 30- Xifidiocercárias encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul.....	141
FIGURA 31- Xifidiocercárias encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul.....	142
FIGURA 32- Xifidiocercárias encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul.....	143
FIGURA 33- Xifidiocercárias encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul.....	144
FIGURA 34- <i>Magnivitellinum</i> sp. Estágios de desenvolvimento encontrados <i>Biomphalaria glabrata</i> no estado do Maranhão. (a) Visão completa da cercária. (b) Detalhe do corpo. (c) Estilete.....	149
FIGURA 35- Haematoloechidae gen. sp. (a) Cercária emergida de <i>Biomphalaria tenagophila</i> naturalmente infectada (b) Detalhe do corpo da cercária (c) Detalhe do estilete.....	153

FIGURA 36- Plagiorchioidea gen. sp.: (a) Cercária emergida de *Biomphalaria tenagophila* naturalmente infectada (b) Detalhe do corpo da cercária. (c) Detalhe do estilete..... 156

FIGURA 37- *Renifer* sp.: (a) Cercária emergida de *Stenophysa marmorata* naturalmente infectada coletada em Caeté, Minas Gerais (b) Detalhe do corpo da cercária. (c) Detalhe do estilete..... 160

FIGURA 38- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região 28S para as amostras de *Haematoloechus* sp., *Magnivitellinum* sp., Haematoloechidae gen. sp, Plagiorchioidea gen. sp. e *Renifer* sp. (em negrito) e outras espécies de Plagiorchioidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo GTR+G+I.. ..... 162

FIGURA 39- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região transcrita interna ITS1-5.8S-ITS2 para as amostras de *Haematoloechus* sp., Haematoloechidae gen. sp. Plagiorchioidea gen. sp. e *Renifer* sp. (em negrito) e outras espécies de Plagiorchioidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo GTR+G. .... 163

FIGURA 40- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene mitocondrial citocromo C oxidase *Cox-I* (Região pós-barcode) para as amostras de *Renifer* sp. (em negrito) e outras espécies de Plagiorchioidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+G.. ..... 164

FIGURA 41- *Crassiphiala* sp. (a) Metacercária encistada encontrada em *Etroplus maculatus*. (b) Metacercária do tipo *Neascus* desencistada.. ..... 174

FIGURA 42- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene 28S para as amostras de *Crassiphiala* sp. (em negrito) e outras espécies de Diplostomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+G..... 175

FIGURA 43- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) para as amostras para as amostras de *Crassiphiala* sp. (em negrito) e outras espécies de Diplostomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+G+I.. ..... 176

FIGURA 44- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene mitocondrial *Cox-1* (Região pós-barcode) para as amostras de *Crassiphiala* sp. (em negrito) e outras espécies de Diplostomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+G..... 177

FIGURA 45- Diplostomidae gen. sp. (a) Cercária emergida de *Drepanotrema lucidum* naturalmente infectado coletado em Januária, Minas Gerais, Brasil. (b) Detalhe do corpo cercariano. (c) Detalhe dos espinhos no órgão anterior..... 180

FIGURA 46 - Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene 28S para as amostras de Diplostomidae gen. sp. (em negrito) e outras espécies de Diplostomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo GTR+G+I.. ..... 182

FIGURA 47- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região transcrita interna ITS1-5.8S-ITS2 para as amostras de Diplostomidae gen. sp. (em negrito) e outras espécies de Diplostomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo GTR+G.. ..... 183

FIGURA 48- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da do gene mitocondrial Citocromo oxidase *Cox-1* (região barcode) para as amostras de Diplostomidae gen. sp. (em negrito) e outras espécies de Diplostomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo TN93+G+I.. ..... 184

FIGURA 49- *Apharyngostrigea pipientis* (a) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* naturalmente infectada coletada em Contagem, Minas Gerais, Brasil. (b) Detalhe do corpo cercariano. (c) Detalhe da largura do tronco caudal. .... 186

FIGURA 50- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região espaçadora transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) para as amostras de *Apharyngostrigea pipientis* (em negrito) e outras espécies de Diplostomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo K2+G..... 187

FIGURA 51- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene citocromo c oxidase subunidade I *Cox-1* (região barcode) para as amostras de *Apharyngostrigea pipientis* (em negrito) e outras espécies de Diplostomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+G+I. .... 188

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Principais tipos cercarianos encontrados em moluscos (PINTO & MELO, 2013a).....	40
TABELA 2- Amostras de trematódeos pertencentes às superfamílias Echinostomatidae, Plagiorchioidea e Diplostomoidea previamente coletadas e utilizadas para análises morfológica e/ou molecular.....	46
TABELA 3- Exemplos de moluscos coletados e infectados por cercárias durante coletas malacológicas realizadas em cinco coleções aquáticas de Minas Gerais, entre os meses de agosto de 2018 e agosto de 2019.....	47
TABELA 4- Primers utilizados para a amplificação de fragmentos dos genes 28S, ITS1-5.8S-ITS2, <i>Cox-1</i> e <i>Nad-1</i> .....	56
TABELA 5. Cercárias do tipo equinóstoma e gimnocéfala encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul.....	61
TABELA 6- Dados morfométricos das cercárias de Echinochasmidae gen. sp., encontradas em <i>Pomacea</i> spp. em Palmeirândia e São Vicente Ferrer, MA e os dados de cercárias similares.....	76
TABELA 7- Dados morfométricos das cercárias de <i>Neopetasisiger</i> sp., encontradas em <i>B. straminea</i> . em Belo Horizonte, Betim e Contagem, Minas Gerais e os dados de cercárias similares.....	84
TABELA 8- Dados morfométricos das cercárias de Echinostomatidae gen sp. 1, encontradas em <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i> em Belo Horizonte, Betim e Contagem, MG e os dados de cercárias similares.....	88
TABELA 9- Dados morfométricos de cercárias de Echinostomatidae gen. sp. 2, encontradas em <i>Pomacea</i> sp. em Januária, Minas Gerais, Brasil, e medidas apresentadas por outros autores.....	95

TABELA 10- Dados morfométricos de cercárias de Echinostomatidae gen. sp. 3 encontradas em <i>Biomphalaria straminea</i> . em Contagem, Minas Gerais, Brasil, e medidas de larvas semelhantes apresentadas por outros autores .....	99
TABELA 11- Dados morfométricos baseados em uma cercária Echinostomatidae gen. sp. 4 encontrada em <i>Biomphalaria glabrata</i> coletada em Januária, Minas Gerais Brasil, e medidas de cercárias semelhantes apresentadas por outros autores .....	103
TABELA 12- Dados morfométricos de cercárias de Echinostomatidae gen sp. 5 encontradas em <i>Biomphalaria</i> sp. no Rio de Janeiro, RJ, Brasil, e dados de larvas semelhantes apresentadas por outros autores .....	108
TABELA 13- Dados morfométricos de cercárias de <i>Rhopalias</i> spp. encontradas em <i>Biomphalaria straminea</i> , <i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>Gundlachia tigaca</i> e <i>Drepanotrema lucidum</i> , em Belo Horizonte, Patos de Minas, Januária e Dores do Indaiá - Minas Gerais, Brasil e medidas de larvas semelhantes apresentadas por outros autores .....	113
TABELA 14- Xifidiocercárias encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul.....	137
TABELA 15- Dados morfométricos de <i>Magnivitellinum</i> sp. obtidas em <i>Biomphalaria glabrata</i> no estado do Maranhão, Brasil. Dados de larvas semelhantes reportadas na América Sul são apresentadas para comparação .....	150
TABELA 16- Dados morfométricos de Haematoloechidae gen. sp. obtidas em <i>Biomphalaria tenagophila</i> no Rio de Janeiro, RJ, Brasil .....	154
TABELA 17- Dados morfométricos de Plagiorchioidea gen. sp. obtidas em <i>Biomphalaria tenagophila</i> no Rio de Janeiro, RJ, Brasil e de larvas semelhantes registradas na América do Sul.....	157
TABELA 18- Dados morfométricos de <i>Renifer</i> sp. de <i>Stenophysa marmorata</i> de Caeté, Minas Gerais, Brasil .....	161

TABELA 19- Dados morfométricos de cercárias de Diplostomidae gen. sp. obtidas de <i>Drepanotrema lucidum</i> em São Joaquim em Minas Gerais, Brasil e dados sobre larvas similares para comparação.....	181
---	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AL: Alemanha	JAN: Januária
AR: Argentina	JP: Japão
AS: África do Sul	L: Largura
AUS: Austrália	LA: Leste de Asia
BD: Bangladesh	LT: Lituânia
BGR: Bulgária	MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
BT: Betim	MDG: Madagascar
BH: Belo Horizonte	MG: Minas Gerais
BIC: Bayesian information criterion	MHN: Museu de História Natural
BM: Biologia molecular	MV: Máxima verossimilhança
BR: Brasil	MX: México
C: Comprimento	<i>Nad-1</i> : Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Desidrogenase Subunidade-1
CA: Canadá	NC: Nicarágua
CL: Chile	NG: Nigéria
CN: China	NO: Noruega
CNT: Contagem	NZ: Nova Zelândia
CR: Costa Rica	OTC: Outros tipos cercarianos
<i>Cox-1</i> : Citocromo oxidase subunidade 1	pb: pares de base
DNA: Ácido desoxirribonucleico	PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
DAI: Dias após infecção	PEG: Polietilenoglicol
DI: Dores do Indaiá	PE: Peru
DK: Dinamarca	PL: Polônia
EC: Equador	PM: Patos de Minas
EG: Egito	PR: Porto Rico
EQ: Equinóstoma	PT: Portugal
ES: Espanha	QUE: Quênia
ESK: Eslováquia	RJ: Rio de Janeiro
EST: Estrigeocercária	rpm: rotações por minutos
EUA: Estados Unidos da América	RT: República Tcheca
F: Frutal	RU: Reino Unido
FI: Finlândia	RUS: Rússia
HU: Hungria	SL: São Luiz
IE: Irlanda	THA: Tailândia
IN: Índia	TZA: Tanzânia
IS: Islândia	UC: Ucrânia
ISR: Israel	VNM: Vietnam
IT: Itália	
ITS1-5.8S-ITS2: Região espaçadora transcrita interna	

## SUMARIO

<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	27
1.1- O parasitismo por Trematoda: generalidades .....	27
1.2.- Biologia dos trematódeos digeneicos .....	29
1.2.1- Trematódeos e Ciclos Biológicos: um breve histórico .....	29
1.2.2- A complexidade dos ciclos biológicos de Trematoda: conhecimento atual .	30
1.2.3- Adaptações biológicas e ciclos biológicos .....	32
1.2.4- Trematódeos como controladores biológicos .....	33
1.2.5- Trematódeos como bioindicadores .....	34
1.3- Larvas de trematódeos encontradas em moluscos .....	35
1.3.1- Biologia e taxonomia de cercárias .....	35
1.4- Taxonomia integrativa e larvas de trematódeos: avanços recentes .....	36
1.5- Larvas de trematódeos na América do Sul .....	39
1.5.1- Estudos moleculares e larvas de trematódeos na América do Sul .....	42
<b>2- JUSTIFICATIVA</b> .....	43
<b>3- OBJETIVOS</b> .....	44
3.1- Objetivo geral .....	44
3.2- Objetivos específicos .....	44
<b>4- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
4.1- Amostras estudadas .....	45
4.1.1- Amostras previamente coletadas (2014-2019) .....	45
4.1.2- Amostras obtidas através de novas coletas malacológicas (2018-2019) .....	45
4.2- Coleta de moluscos .....	49
4.3- Avaliação da infecção por larvas de trematódeos .....	49
4.4- Estudos experimentais .....	49
4.4.1- Obtenção experimental de metacercárias .....	50
4.5- Estudo morfológico dos estágios evolutivos .....	50
4.6- Estudo molecular .....	51
4.6.1- Fixação das cercárias .....	51
4.6.2- Extração e quantificação de DNA .....	51
4.6.3- Amplificação do DNA .....	51
4.6.5- Sequenciamento de DNA .....	52

4.6.6 <i>Análises das sequências</i> .....	52
4.7- Identificação taxonômica.....	53
4.8- Delimitação de espécies.....	54
<b>5.- RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>58</b>
<b>5.1- CAPÍTULO 1: Larvas de trematódeos da superfamília Echinostomatoidea encontradas em moluscos do Brasil</b> .....	<b>59</b>
5.1.1- Revisão da literatura .....	59
5.1.2- Resultados.....	72
5.1.2.1- Echinochasmidae gen. sp. (Echinostomatoidea: Echinochasmidae).....	72
5.1.2.1.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	72
5.1.2.1.2- <i>Estudo molecular</i> .....	72
5.1.2.1.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	74
5.1.2.2- <i>Drepanocephalus</i> spathans Dietz, 1909 (Echinostomatoidea: Echinostomatidae) .....	79
5.1.2.2.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	79
5.1.2.2.2- <i>Estudo molecular</i> .....	79
5.1.2.2.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	79
5.1.2.3- <i>Neopetasiger</i> sp. (Echinostomatoidea: Echinostomatidae).....	81
5.1.2.3.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	81
5.1.2.3.2- <i>Estudo molecular</i> .....	81
5.1.2.3.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	82
5.1.2.4- Echinostomatidae gen. sp. 1 (Echinostomatoidea: Echinostomatidae)..	85
5.1.2.4.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	85
5.1.2.4.2- <i>Estudo molecular</i> .....	85
5.1.2.4.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	86
5.1.2.5- Echinostomatidae gen. sp. 2 (Echinostomatoidea: Echinostomatidae)..	92
5.1.2.5.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	92
5.1.2.5.2- <i>Estudo molecular</i> .....	92
5.1.2.5.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	92
5.1.2.6- Echinostomatidae gen. sp. 3 (Echinostomatoidea: Echinostomatidae)....	96
5.1.2.6.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	96
5.1.2.6.2- <i>Estudo molecular</i> .....	96
5.1.2.6.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	97
5.1.2.7- Echinostomatidae gen. sp. 4 (Echinostomatoidea: Echinostomatidae)	100

5.2.2.7.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	100
5.1.2.7.2- <i>Estudo molecular</i> .....	101
5.1.2.7.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	101
5.1.2.8- Echinostomatidae gen. sp. 5 (Echinostomatoidea: Echinostomatidae) 106	
5.1.2.8.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	106
5.1.2.8.2- <i>Estudo molecular</i> .....	106
5.1.2.8.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	106
5.1.2.9- <i>Rhopalias</i> spp. (Echinostomatoidea: Echinostomatidae).....	109
5.1.2.9.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	109
5.1.2.9.2- <i>Estudo molecular</i> .....	109
5.1.2.9.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	111
5.1.2.10- <i>Ribeiroia</i> sp. (Echinostomatoidea: Echinostomatidae).....	114
5.1.2.10.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	114
5.1.2.10.2- <i>Estudo molecular</i> .....	114
5.1.2.10.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	115
5.1.3- <i>Discussão</i> .....	122
<b>5.2- CAPÍTULO 2: Larvas de trematódeos da Superfamília Plagiorchioidea em moluscos do Brasil</b> .....	134
5.2.1- <i>Revisão da literatura</i> .....	134
5.2.2- <i>Resultados</i> .....	145
5.2.2.1- <i>Haematoloechus</i> sp. (Plagiorchioidea: Haematoloechidae).....	145
5.2.2.1.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	145
5.2.2.1.2- <i>Estudo molecular</i> .....	145
5.2.2.1.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	146
5.2.2.2- <i>Magnivitellinum</i> sp. (Plagiorchioidea: Alloglossidiidae).....	147
5.2.2.2.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	147
5.2.2.2.2- <i>Estudo molecular</i> .....	147
5.2.2.2.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	147
5.2.2.3- Haematoloechidae gen. sp. (Plagiorchioidea: Haematoloechidae).....	151
5.2.2.3.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	151
5.2.2.3.2- <i>Estudo molecular</i> .....	151
5.2.2.3.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	152
5.2.2.4- Plagiorchioidea gen. sp. (Plagiorchioidea).....	155
5.2.2.4.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	155

5.2.2.4.2- <i>Estudo molecular</i> .....	155
5.2.2.4.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	155
5.2.2.5- <i>Renifer</i> sp. (Plagiorchioidea: Reniferidae) .....	158
5.2.2.5.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	158
5.2.2.5.2- <i>Estudo molecular</i> .....	158
5.2.2.5.3 <i>Comentários taxonômicos</i> .....	159
5.2.3 <i>Discussão</i> .....	165
<b>5.3- CAPÍTULO 3: Larvas de trematódeos da superfamília Diplostomoidea em moluscos do Brasil</b> .....	170
5.3.1- <i>Revisão da literatura</i> .....	170
5.3.2- <i>Resultados</i> .....	172
5.3.2.1- <i>Crassiphiala</i> sp. (Diplostomoidea: Diplostomidae).....	172
5.3.2.1.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	172
5.3.2.1.2- <i>Estudo molecular</i> .....	173
5.3.2.1.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	174
5.3.2.2- <i>Diplostomidae</i> gen. sp. (Diplostomoidea: Diplostomidae) .....	178
5.3.2.2.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	178
5.3.2.2.2- <i>Estudo molecular</i> .....	178
5.3.2.2.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	179
5.3.2.3- <i>Apharyngostrigea pipientis</i> (Diplostomoidea: Strigeidae).....	185
5.3.2.3.1- <i>Caracterização morfológica</i> .....	185
5.3.2.3.2- <i>Estudo molecular</i> .....	185
5.3.2.3.3- <i>Comentários taxonômicos</i> .....	185
5.3.3 <i>Discussão</i> .....	189
<b>6.- CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	192
<b>7.- CONCLUSÕES</b> .....	194
<b>8- REFERÊNCIAS</b> .....	196
<b>ANEXO 1: RESUMO DAS ANÁLISES</b> .....	249
<b>ANEXO 2: TABELAS DE DIVERGÊNCIAS</b> .....	250
<b>ANEXO 3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA NO PERÍODO 2018-2022</b> .....	279

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1- O parasitismo por Trematoda: generalidades

O parasitismo é um dos estilos de vida mais comuns entre os eucariotos, também é um dos modos de vida mais bem-sucedidos, o que pode ser medido pelo número de vezes que evoluiu independentemente e a diversidade de espécies de parasitos existentes (POULIN & MORAND, 2014). Entre os diferentes grupos de helmintos parasitos, encontram-se os representantes do filo Platyhelminthes Minot, 1876 pertencentes ao subfilo Neodermata Ehlers, 1985, formado pelas classes Cestoda Van Beneden, 1849, Monogenea Carus, 1863 e Trematoda Rudolphi, 1808 (CHENG, 1977; FRIED & GRACZYK, 1997; OLSON *et al.*, 2001; CRIBB *et al.*, 2002; OLSON & TKACH, 2005). A classe Trematoda compreende duas subclasses, Aspidogastrea Faust & Tang, 1936 e Digenea Carus, 1863 (CRIBB *et al.*, 2001a; GIBSON *et al.*, 2002; KOSTADINOVA & PÉREZ-DEL OLMO, 2014). A primeira é formada por 4 famílias, 12 gêneros e cerca de 80 espécies consideradas válidas, as quais parasitam moluscos, peixes e quelônios (ROHDE 2001; 2002, ALVES *et al.*, 2015). Já a subclasse Digenea, foco do presente estudo, compreende um grupo diverso de platelmintos cosmopolitas, parasitos de todas as classes de vertebrados, com cerca de 2.500 gêneros e 18.000 espécies nominais descritas (CRIBB *et al.*, 2001a; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, 2001; GIBSON *et al.*, 2002; OLSON *et al.*, 2003; KOSTADINOVA & PÉREZ-DEL OLMO, 2014; LITTLEWOOD *et al.*, 2015).

Os representantes da subclasse Digenea ocorrem em diferentes tipos de ambientes, como mares, rios e lagoas e em todas as massas continentais. Morfologicamente, possuem um corpo com tegumento (sem cutícula), geralmente com simetria bilateral, acelomados, sem anus. Com um baixo nível de cefalização, hermafroditas (com algumas exceções) e dorsoventralmente planos, são comumente pequenos, mas podem alcançar tamanhos maiores (LITTLEWOOD, 2006). Quando adultos, parasitam uma grande variedade de vertebrados, apresentando como sítio de infecção principalmente o trato gastrointestinal, apesar de várias espécies serem encontradas nas vias sanguíneas (Sanguinicolidae, Schistosomatidae, Spirorchidae), respiratórias (Paragonimidae, Typhlocoelidae, Troglotrematidae, Haematoloechidae), no olho (Philophthalmidae), sistema urogenital (Eucotylidae, Rencolidae), dentre outros (BLAIR *et al.*, 1999; 2008 NOLAN & CRIBB, 2006; SANTORO *et al.*, 2007; BRANT & LOCKER, 2009; DARE & FORBES, 2009; PINTO & MELO *et al.*, 2010; TAVELA *et al.*, 2014; ENSUNCHO *et al.*, 2017).

Várias espécies de trematódeos digenéticos apresentam importância médica e veterinária em diferentes partes do mundo, justificando ainda mais o estudo destes parasitos. A importância médica pode ser ressaltada pelo fato de mais de 150 espécies já terem sido relatadas infectando seres humanos (MULLER & WAKELIN, 2002), causando doenças como a esquistossomose e as trematodíases (KATZ & PEIXOTO, 2000; STEINMANN *et al.*, 2006; KEISER & UTZINGER, 2009). Outros casos menos frequentes são provocados por parasitos da família Echinostomatidae (RYANG *et al.*, 1986; HUFFMAN & FRIED, 1990; EDUARDO, 1991; SAH *et al.*, 2018), Paramphistomidae (MAS-COMAS *et al.*, 2006; LONGA *et al.*, 2010) e algumas espécies de Diplostomoidea (FERNANDES *et al.*, 1976; FREEMAN *et al.*, 1976; MÖHL *et al.*, 2009), com casos humanos relatados em algumas regiões da Europa e Ásia. Além disso, afecções causadas por contato de humanos com larvas de trematódeos já têm sido bem documentadas. Como exemplo, casos de dermatite cercariana (também observada na fase aguda da esquistossomose humana) por esquistossomatídeos de aves são constantemente relatados na Europa e América do Norte. Esta manifestação cutânea é considerada uma doença emergente e acreditasse que esteja associada às mudanças climáticas e o contato direto dos humanos com corpos de água eutrofizados, produzindo alterações nos ciclos biológicos dos parasitos e aumentando sua frequência (GENTILE *et al.*, 1996; KOLÁŘOVÁ, 2007; HORÁK & KOLÁŘOVÁ, 2011; SOLDÁNOVÁ *et al.*, 2013). No Brasil, apesar da ausência de casos humanos a ocorrência desta doença já foi sugerida, tendo em vista os registros prévios desses parasitos em aves e moluscos (PINTO *et al.*, 2012a). Também, vários casos de ocorrência de granulomas oculares provocados pelo contato com cercárias da família Heterophyidae foram relatados na Índia (RATHINAM *et al.*, 2002; ARYA *et al.*, 2016).

Entre os trematódeos, há dezenas de espécies com importância veterinária envolvidas em prejuízos à pecuária (p. ex. *Fasciola hepatica* (L.), *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) e *Paramphistomum* spp.) (MATTOS & UENO, 1996; BASSANI *et al.*, 2007). Além disso, várias espécies foram associadas a problemas na piscicultura, tendo em vista que o parasitismo pode levar à ocorrência de mortalidade e atraso de desenvolvimento (p. ex., *Centrocestus formosamus* (Nishigori, 1924), *Clinostomum* spp., espécies da família Diplostomidae) (MITCHELL *et al.*, 2005; THATCHER, 2006; FLORES-LOPES & THOMAZ, 2011). Além destes parasitos considerados de maior importância para o ser humano, existe uma diversidade de trematódeos que parasitam animais silvestres, cujo potencial zoonótico ou impactos na área de medicina veterinária são ainda desconhecidos. Por outro lado,

o reconhecimento da importância destes parasitos em um contexto de biodiversidade vem sendo enfatizada nos últimos tempos (POULIN & MORAND, 2014; CRIBB, 2016).

## 1.2.- Biologia dos trematódeos digenéticos

### 1.2.1-Trematódeos e ciclos biológicos: um breve histórico

Há mais de dois séculos, através da publicação “Systema Naturae” de Linneus em 1778, iniciou-se a classificação de trematódeos no sistema binomial que hoje em dia conhecemos (primeiro gênero descrito: *Fasciola* L.). Porém, antes dessa data, alguns estudos relacionados a larvas de trematódeos já haviam sido publicados por Jan Swammerdam (1737/1738). Nesta época as larvas eram conhecidas como organismos de vida livre, chegando a serem agrupadas com protozoários. Além disso, foram propostos nomes como "*Cercaria*" Müller, 1773, "*Furcocerca*" Lamarck, 1815, e "*Histrionella*" Bory de St. Vincent, 1823 como nomes genéricos para vermes encontrados em moluscos e considerados como adultos. No século XIX poucas espécies foram identificadas (como *Fasciola hepatica*) e os nomes genéricos estavam baseados nos órgãos de fixação (Distoma, Monostoma, Anfistoma). Nesse contexto, não existia nenhuma referência sobre as fases larvais de trematódeos na época, e alguns estudos foram elucidando muitos dos processos biológicos que se conhece hoje em dia. Contudo, os avanços eram em ritmo relativamente lento e ainda existiam muitas lacunas. Algumas contribuições foram feitas por Bojanus (1818), quem reconheceu que as cercárias tinham sua origem em moluscos dentro de sacos que chamou de “sacos amarelos reais”. Nessa mesma publicação, Oken, em nota de rodapé, reconhece que cercárias de moluscos e Distomas de vertebrados eram relacionados, sendo que as primeiras não são mais que embriões dos segundos. Além disso, de Filipi (1837) cunhou o nome “*Redia*” para esses “sacos amarelos reais” e em 1853 aceitou que as cercárias são um estágio larval, sugerindo que o nome rédia não seja mais usado como gênero. Em relação a outros estágios larvais como miracídio e esporocisto, o primeiro foi observado pela primeira vez por Mehlis (1831) no ovo de *Monostomum flavum* (atualmente *Typhlocoelum flavum*) e mais tarde por v. Siebold (1835) no ovo de *M. mutabile* (atualmente *Cyclocoelum mutabile*). Assim, estabeleceu-se que as rédias são descendentes do miracídio. Já o termo “sporocystis” (esporocisto) é creditado a v. Baer por Stiles & Hassall (1908) (LA RUE, 1957).

Desde então numerosas observações sobre a história de vida dos trematódeos foram se acumulando, dando suporte para a descrição do princípio de alternância de geração por

Steenstrup (1842). Com o passar dos anos o interesse por estas larvas foi aumentando, levando a que pesquisadores como Diesing (1850) (que ainda considerava as cercárias como adultos), a criar uma subordem para elas. Este mesmo autor, em 1855, fez uma revisão sobre cercárias, reconhecendo 20 espécies e 9 gêneros. Porém, mais tarde, ele passou a aceitar a natureza larval das cercárias, mas continuou a usar nomes genéricos para elas (Diesing, 1858a). Apesar desses fatos, ainda existiam muitas incógnitas no que se referia aos ciclos biológicos dos trematódeos. Os estudos mais significativos nesse período foram os de Leuckart (1882) e Thomas (1883), quem elucidaram de maneira independente, o ciclo de *Fasciola hepatica*. Esses estudos, baseados em observações cuidadosas e experimentos bem controlados, serviram de modelos para muitos estudos subsequentes envolvendo ciclos biológicos de trematódeos (revisado por LA RUE, 1957).

### *1.2.2- A complexidade dos ciclos biológicos de Trematoda: conhecimento atual*

Os ciclos biológicos dos trematódeos digenéticos são muito complexos, envolvendo muitas variações e tipos de hospedeiros, estágios larvais morfologicamente distintos, e diferentes mecanismos de infecção dos diferentes hospedeiros (CRIBB *et al.*, 2003). Estes ciclos podem ocorrer em três tipos de ambientes: (i) aquático com todos os hospedeiros sendo animais aquáticos obrigatórios ou vivendo em estreita associação com a água; (ii) semi-aquático, no qual gerações partenogenéticas e metacercárias parasitam organismos aquáticos e o hospedeiro definitivo representa uma espécie terrestre; (iii) terrestre, no qual todo o ciclo de vida envolve animais terrestres (NIEWIADOMSKA & POJMAŃSKA, 2011). Para a perpetuação das espécies em cada um destes tipos de ambiente, várias estratégias adaptativas foram desenvolvidas para facilitar os mecanismos de transmissão, permitindo-lhes assim, completar seus complexos ciclos de vida (NIEWIADOMSKA & POJMAŃSKA, 2011).

A maioria das espécies de trematódeos possuem um molusco como primeiro hospedeiro intermediário, no qual acontece a fase de reprodução assexuada. A maior parte das espécies possui também um segundo hospedeiro intermediário, que dependendo da espécie do parasito, pode ser um peixe, anfíbio, molusco, anelídeo ou invertebrados de outros grupos zoológicos (LAFFERTY, 1999). O ciclo biológico é basicamente diheteroxeno e poliheteroxeno, iniciando quando os ovos já fecundados (embrionados ou não), abandonam o hospedeiro definitivo. Dependendo da espécie, os miracídios podem já estar formados no interior do ovo, emergindo pelo opérculo (presente na maioria das espécies) após contato com o ambiente hídrico. Os

miracídios nadam ativamente na busca de um molusco aquático adequado para continuar seu desenvolvimento, sendo atraído pelos estímulos quimiotáticos. Após o encontro, ocorre a penetração com o auxílio de secreções presentes em suas glândulas cefálicas e a perda das placas ciliares. Em outras espécies, o ovo é ingerido e o miracídio liberado no interior do hospedeiro intermediário. Independentemente do modo de infecção, uma vez no molusco, o miracídio dá origem a esporocistos e/ou rédias, estágios de desenvolvimento responsáveis pela produção de cercárias. O fenômeno envolvido na produção de cercárias em esporocistos e rédias foi estabelecido como partenogênese apomítica (revisado por GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003).

A maior parte das espécies de trematódeos possui um segundo hospedeiro intermediário (outro molusco, larva de inseto, crustáceos, peixes ou outro vertebrado) em seu ciclo de vida. Neles são formadas metacercárias, formas infectantes transmitidas passivamente aos hospedeiros definitivos através de uma relação trófica. Geralmente, a transformação em metacercária não requer modificações morfológicas substanciais, necessitando apenas de maior desenvolvimento dos sistemas de tecidos e órgãos da larva (FRIED & GRACZYK, 1997). Pelo menos 17 das 22 superfamílias destes parasitos possuem segundos hospedeiros intermediários em seus ciclos de vida (CRIBB *et al.*, 2003). O hospedeiro definitivo (um vertebrado) é finalmente infectado quando as metacercárias, presentes no segundo hospedeiro intermediário, são ingeridas. Após este processo, os parasitos alcançam os respectivos sítios de infecção, amadurecem e iniciam a fase de infecção sexuada, que culmina na produção de ovos (DAWES, 1968; FRIED & TOLEDO, 2009; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003).

Tendo em conta esse contexto diverso de possibilidades de ciclos biológicos, o estudo das cercárias pode auxiliar no conhecimento dessa variabilidade. CRIBB *et al.* (2003) revisaram os diversos modos de infecção do hospedeiro definitivo, a saber: (i) penetração da cercária diretamente no hospedeiro definitivo (Schistosomatidae, Spirorchiidae e Sanguinicolidae); (ii) fixação da cercária à superfície do hospedeiro definitivo (Transversotrematidae); (iii) ingestão da cercária diretamente pelo hospedeiro definitivo (alguns Bivesiculidae, Azygiidae, Fellodistomidae e Tandanicolidae); (iv) ingestão da cercária por um segundo hospedeiro intermediário e formação de metacercária, que alcançara o hospedeiro definitivo passivamente após a predação deste segundo hospedeiro intermediário (Hemiuroidea Fellodistomidae, Bivesiculidae e Azygiidae); (v) encistamento da cercária no meio externo, com a formação da metacercária em uma fonte potencial de alimento (p. ex. água e vegetação) para o hospedeiro definitivo (Paramphistomidae, Haploplanchnoidea, alguns Echinostomatoidea e

Haploporidae); (vi) penetração da cercária em um segundo hospedeiro intermediário e desenvolvimento em metacercária, sendo a transmissão ao hospedeiro definitivo também por predação do segundo hospedeiro intermediário (Diplostomoidea, Bucephaloidea, Opisthorchioidea, Echinostomatoidea, Lepocreadioidea e Xiphidiata); (vii) a cercária e metacercária permanecem no molusco hospedeiro intermediário, o qual é ingerido pelo hospedeiro definitivo (Heronimidae, Cyclocoelidae, Eucotylidae e Hasstilesiidae e Leucochloridiidae) (DAWES, 1968; GALAKTIONOV & DOBROVOLSKIJ, 2003).

### 1.2.3- Adaptações biológicas e ciclos biológicos

O conhecimento acumulado ao longo de anos de estudo sobre a biologia de trematódeos revelou a existência de importantes adaptações relacionadas a manutenção dos diferentes ciclos biológicos. Alguns casos de estratégias envolvendo manipulação parasitária são conhecidos. Por exemplo, *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819), um trematódeo da família Dicrocoeliidae encontrado na fase adulta em ruminantes, possui como segundo hospedeiro intermediário formigas. Estes insetos, entram em contato com as “bolas de muco” contendo as cercárias, as quais são expelidas pelo molusco primeiro hospedeiro intermediário. Essas cercárias, após ingestão, se instalam no gânglio esofágico da formiga, onde se encistam em metacercárias. Em condições favoráveis (diminuição da temperatura), o parasito pode causar um estado de tetania nas peças bucais da formiga, fazendo com que esta fique com a mandíbula fixa na vegetação. Com esse processo, aumenta-se as chances do hospedeiro definitivo (ruminantes) ingerir acidentalmente o inseto infectado, resultando na transmissão do parasito (MANGA-GONZÁLEZ *et al.*, 2001). Outro caso muito particular é verificado no ciclo biológico de espécies do gênero *Leucochloridium*. As cercárias não abandonam o hospedeiro intermediário (molusco terrestre), ficando dentro do esporocisto, que se dirige até as antenas do molusco produzindo uma coloração chamativa, além de mudanças nos horários de exposição do molusco, o que também facilita a predação do molusco pelo hospedeiro definitivo, nesse caso aves (WESOLOWSKA & WESOLOWSKI, 2013). Outro caso de manipulação parasitária é discutido para *Riberoia ondatrae* (Price, 1931), parasito de aves na América do Norte. As cercárias penetram no segundo hospedeiro intermediário, que são girinos, nos quais se encistam e causam alterações patológicas que desencadeiam o desenvolvimento anormal de membros (extras ou ausentes) durante sua metamorfose. O resultado deste processo é um anfíbio adulto

com dificuldades de locomoção, ficando mais exposto e fácil de ser predado pelo hospedeiro definitivo (JOHNSON *et al.*, 2004; SZUROCZKI *et al.*, 2012).

#### 1.2.4- Trematódeos como controladores biológicos

Existem várias formas de controle biológico, seja por meio de predação, parasitismo, competição direta ou indireta, modificação do habitat ou uma combinação desses processos. A associação entre trematódeos e moluscos já tem sido relatada como possível forma de controle biológico de parasitos de importância médica, como *Schistosoma mansoni* (KURIS, 1973) e veterinária, como *Fasciola hepatica* (SUHARDONO *et al.*, 2006). A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada, sendo o controle biológico proposto como uma das estratégias para o controle dos moluscos hospedeiros intermediários. Nesse sentido, estudos baseados na avaliação da coinfeção de *Biomphalaria* spp. por *S. mansoni* e parasitos dos gêneros *Cotylurus* Szidat, 1928, *Paryphostomum* Dietz, 1909, *Ribeiroia* Travassos, 1939 e *Plagiorchis* Lühe, 1899, revelaram que o desenvolvimento do primeiro trematódeo pode ser afetado pela presença de larvas destes outros parasitos. As alterações fisiológicas verificadas nos moluscos hospedeiros resultam de uma relação antagônica, que pode ser direta ou indireta, como discutido por diferentes autores (BASCH *et al.*, 1969; BASCH, 1970; LIM & HEYNEMAN, 1972; KURIS, 1973; LIE, 1973; COMBES, 1982; MACHADO *et al.*, 1988; ESTEBAN *et al.*, 2011).

Em uma outra vertente, os parasitos podem atuar como controladores biológicos das populações dos seus próprios hospedeiros intermediários. Vários trematódeos podem alterar a estratégia de alocação energética do hospedeiro, direcionando-a para a reprodução parasitária (KURIS, 1974; BAUDOIN, 1975). Este fenômeno é conhecido como “castração parasitária” (LAFFERTY & KURIS, 2002). Em um estudo realizado por CHENG *et al.* (1973), foi observado que as gônadas do molusco *Nassarius obsoletus*, parasitados por esporocistos do trematódeo *Zoogonus rubellus* (Olsson, 1868) estavam quase completamente ausentes. Os autores discutem que o fenômeno foi produto de uma castração química por parte de substâncias secretadas pelo parasito. Sabe-se que *N. obsoletus* é hospedeiro intermediário de alguns esquistosomatídeos de aves (que causam a dermatite cercariana) na mesma área de coleta, isso aumenta a relevância de *Z. rubellus* como um potencial controlador biológico.

Outras estratégias de controle biológico envolvendo trematódeos estão associadas às larvas do tipo xifidiocercárias que se encistam em larvas de insetos vetores de doenças. Uns

dos mais importantes é o controle realizado às larvas de culicídeos, dos gêneros *Aedes* Meigen, 1818, *Culex* Linnaeus, 1758 e *Anopheles* Meigen, 1818 (que transmitem doenças como dengue e malária). Estes insetos podem atuar como segundos hospedeiros intermediários de espécies de *Haematoloechus* Looss, 1899, *Plagiorchis* Lühe, 1899 e *Prosthogonimus* Lühe, 1899 (PINTO & MELO, 2013a).

### 1.2.5- Trematódeos como bioindicadores

Um bioindicador é um organismo (ou parte de um organismo ou uma comunidade de organismos) que contém informações sobre a qualidade do meio ambiente (MARKERT *et al.*, 1997). Muitos parasitos têm ciclos de vida envolvendo vários hospedeiros, portanto, podem ser excelentes indicadores de outros componentes da estrutura e função da comunidade (GARDNER & CAMPBELL 1992; MARCOGLIESE & CONE 1998). Os trematódeos digeneicos são particularmente um grupo de indicadores promissores (KURIS & LAFFERTY 1994; HUSPENI & LAFFERTY 2004; HUSPENI *et al.*, 2005; VIDAL-MARTÍNEZ, 2007; SURES, 2008; VIDAL-MARTÍNEZ *et al.*, 2010). Assim, uma fauna diversa e abundante de hospedeiros definitivos deve resultar em uma comunidade diversa e abundante de larvas trematódeos nos moluscos hospedeiros intermediários (LAFFERTY, 1997; HUSPENI & LAFFERTY, 2004; HUSPENI *et al.*, 2005; MARCOGLIESE, 2005; LAFFERTY *et al.*, 2006). Nessas circunstâncias, a alta riqueza de espécies de parasitos em moluscos hospedeiros indica a presença de numerosos grupos de organismos. Dessa maneira, esses parasitos não apenas refletem a presença de táxons circundantes, mas também são indicativos diretos de ligações tróficas funcionais (GARDNER & CAMPBELL 1992; MARCOGLIESE & CONE 1998). Também são ótimos candidatos a bioindicadores devido ao menor custo de amostragem e análises de moluscos que atuam como hospedeiros intermediários, em comparação ao estudo de hospedeiros vertebrados (HUSPENI & LAFFERTY, 2004; HUSPENI *et al.*, 2005; SHEA *et al.*, 2012).

O efeito dos ambientes poluídos sobre as comunidades parasitárias também tem sido estudado. A eutrofização já foi mencionada como um fator que favorece o estabelecimento de hospedeiros que possam participar nas diferentes fases dos ciclos de trematódeos (LAFFERTY, 1997; JOHNSON *et al.*, 2007; BLANAR *et al.*, 2009; SOLDÁNOVÁ & KOSTADINOVA, 2011). Por outro lado, os parasitos podem ser afetados por poluentes diversos. CROSS *et al.* (2004), observaram que cercárias de *Cryptocotyle lingua* (Creplin 1825) em ambientes

poluídos, reduzem sua natação e fazem percursos mais longos. Estes autores sugeriram que os poluentes acumulados pelas cercárias afeta a neuromusculatura associada ao desempenho da natação. Sob o mesmo ponto de vista, PIETROCK *et al.* (2002) e MORLEY *et al.* (2002) estudaram a influência do cádmio na sobrevivência e desenvolvimento de cercárias de *Diplostomum* sp. e metacercárias de *Notocotylus attenuatus* (Rudolphi, 1809) respectivamente. Evidenciou-se que a sobrevivência das cercárias pode ser reduzida pela exposição direta a metais pesados e que existe de fato uma diminuição no encistamento de metacercárias. A contaminação por metais pesados em habitats aquáticos, portanto, pode potencialmente ter um impacto nas populações e comunidades de parasitos (PIETROCK *et al.*, 2002).

A temperatura também é um fator importante que influencia a biologia dos organismos e é intrinsecamente ligada às mudanças climáticas (MORLEY & LEWIE, 2015). O estabelecimento de trematódeos em hospedeiros alvo é potencialmente suscetível a mudanças de temperatura, as quais podem afetar a infectividade do parasito ou a suscetibilidade do hospedeiro. As evidências disponíveis indicam que as mudanças na abundância local do parasito mediadas pelo clima terão repercussões significativas para os ecossistemas interditais. Efeitos marcantes sobre a produção de cercárias em trematódeos podem ser verificados até mesmo nos casos de leves aumentos na temperatura o que poderia formar a base para programas de monitoramento, e fornecer sinais de alerta precoce dos impactos ambientais do aquecimento global (POULIN & MOURITSEN, 2006).

### 1.3- Larvas de trematódeos encontradas em moluscos

#### 1.3.1- *Biologia e taxonomia de cercárias*

As cercárias são, em sua maioria, organismos de vida livre que emergem dos moluscos geralmente em grande quantidade. Morfologicamente, possuem corpo oval ou alongado, achatado no plano dorsoventral, e uma cauda que pode ser longa. A ventosa oral é subterminal, disposta na extremidade anterior do corpo. Na maioria dos casos encontra-se uma ventosa ventral na região média do corpo. No corpo larval podem ser vistos sistemas digestivos e protonefridiais mais ou menos bem desenvolvidos, glândulas de diferentes tipos, primórdio genital e órgãos sensoriais, representados principalmente por papilas sensoriais externas e mais raramente por manchas oculares, podem estar presentes. Em relação à cauda, a morfologia varia dependendo da espécie e de sua função principal (proporcionando locomoção e aderência ou

rastejamento no substrato e flutuando ou nadando na água) (GALAKTIONOV e DOBROVOLSKIJ 2003; MCMULLEN, 1937; OLSON *et al.*, 2003). Estas larvas são verificadas, na maioria das vezes, como parte do zooplâncton em ambientes aquáticos. Não se alimentam, sendo a fonte energética dependente de uma reserva limitada de glicogênio. Assim, as cercárias sobrevivem por um tempo limitado variando de horas a alguns dias, com diminuição de sua infectividade com o passar do tempo (COMBES *et al.*, 1994).

Com o passar dos anos, a quantidade de cercárias descritas aumentou exponencialmente, o que levou a realização de tentativas de distinção e classificação dos diferentes tipos morfológicos. Durante alguns anos foi usado o sistema de tipos cercarianos proposto por Lühe (1909) (DAWES, 1946). Nos anos subsequentes esse sistema foi complementado dos outros autores.

Dentro desse sistema, existem alguns grupos que refletem verdadeiras relações filogenéticas entre diferentes taxa de trematódeos, o que permite inferências sobre as possíveis famílias e assim, os prováveis padrões de ciclos e hospedeiros de outros estágios evolutivos. Em outros casos, os tipos cercarianos são um agrupamento artificial, contemplando espécies de grupos diversos e não filogeneticamente relacionados. Na tabela 1 são apresentados alguns tipos cercarianos e as famílias nas quais estes estão presentes.

#### 1.4- Taxonomia integrativa e larvas de trematódeos: avanços recentes

Os dados morfológicos têm sido a pedra angular da taxonomia de trematódeos, e ainda com o passar do tempo continua sendo eficaz com centos de espécies reconhecidas, sendo que estas foram só descritas através do uso da taxonomia tradicional ou morfológica. Mas, na maioria das vezes o uso da morfologia de uma forma isolada, excluindo os dados de ciclo de vida, e tendo em conta que as larvas são morfológicamente diferentes dos adultos, não resulta ser uma ferramenta suficientemente efetiva para o reconhecimento da plasticidade fenotípica intraespecífica e a variação interespecífica em alguns gêneros que são muito ricos em espécies (BLASCO-COSTA *et al.*, 2016).

Sob essa premissa, a taxonomia integrativa foi formalmente introduzida em 2005 como uma estrutura abrangente que integra todas as fontes de dados disponíveis para enquadrar os limites das espécies e é definida como a ciência usada para delimitar a diversidade das unidades de vida desde várias perspectivas múltiplas e complementarias (DAYRAT 2005; WILL *et al.*, 2005; YEATES *et al.*, 2011). Esta proposta esteve baseada na suspeita de que a maioria das

espécies permaneceria não descrita (ERWIN, 1982; MORA *et al.*, 2011; COSTELLO *et al.*, 2013) e que algumas delas provavelmente iriam se extinguir antes de serem descritas (LEAKEY & LEWIN, 1995; PIMM *et al.*, 2006; BARNOSKY *et al.*, 2011). Dessa maneira, o uso de dados moleculares, e em particular o DNA *barcode* (HEBERT *et al.*, 2003), foi apresentado como uma resposta a esta problemática. Assim, acrescenta ao conjunto de ferramentas da taxonomia, que continua seu desenvolvimento como uma disciplina sinérgica envolvendo diversas áreas (filogeografia, morfologia comparativa, populações genéticas, ecologia, desenvolvimento, comportamento, etc.) (KNAPP, 2008). A taxonomia integrativa é organizada seguindo um fluxo de trabalho de três etapas: a) inclusão de dados morfológicos, ecológicos, moleculares, etc., de vários espécimes; b) circunscrever grupos de organismos usando conceitos que garantam que esses grupos correspondam a espécies e c) realizar um diagnóstico e dar um nome para a espécie reconhecida como nova (PANTE *et al.*, 2015). Dessa maneira a taxonomia integrativa tem como fundamento a procura de informação para responder as perguntas da biologia, como um método para reunir a taxonomia tradicional com a molecular e superar o impedimento taxonômico.

Para a obtenção desses dados moleculares, uma das ferramentas mais utilizadas é a reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta tem sido uma peça fundamental na identificação mais precisa de algumas espécies (SAIKI *et al.*, 1988) junto com o uso de marcadores moleculares e as tecnologias de sequenciamento de DNA, fornecendo um relevante avanço ante as limitações apresentadas com a morfologia. De fato, desde o final dos anos 1980 e o início dos anos 1990 (BLAIR & MCMANUS, 1989; LUTON *et al.*, 1992; ADLARD *et al.*, 1993), houve um aumento dramático no uso de dados moleculares na taxonomia e sistemática de trematódeos (BRANT *et al.*, 2006; LOCKE *et al.*, 2011; FALTÝNKOVÁ *et al.*, 2014; BLASCO-COSTA *et al.*, 2016).

Os marcadores moleculares oferecem ótimas ferramentas para estudar processos como transmissão, evolução da especificidade ao hospedeiro e padrões de especiação, além da elucidação de uma enorme diversidade de ciclos de vida (CRISCIONE *et al.*, 2005). A utilização dos métodos moleculares como um aporte à taxonomia de helmintos demonstrou como diversidade de parasitos é subestimada. De fato, um significativo número de “espécies crípticas” (espécies morfológicamente semelhantes, mas geneticamente distintas) (HUNG *et al.*, 1999; JOUSSON *et al.*, 2000) de trematódeos vem sendo descritas nas últimas décadas.

O uso de marcadores moleculares, possibilita uma identificação mais detalhada e robusta de diferentes organismos. Entre os marcadores mais comuns está o gene do RNA ribossômico

(rRNA) e as regiões espaçadoras associadas. Essa região é altamente informativa para investigações taxonômicas. Acredita-se que a totalidade da unidade de repetição evolua em concerto (NOLAN & CRIBB, 2005). O gene da subunidade pequena do rRNA (SSU ou 18S) é uma das regiões genéticas com uma taxa de evolução mais lenta. É recomendado para inferir relações filogenéticas profundas (ou seja, entre famílias e níveis superiores) (HILLIS & DAVIS, 1986). Já o gene 28S rRNA mostra uma taxa de evolução mais rápida nos domínios variáveis. Contudo, também possui regiões conservadas, semelhantes às verificadas no 18S (HILLIS & DIXON, 1991). Ambos os marcadores têm sido inicialmente utilizados para definir limites de gêneros (KAUKAS & ROLLINSON, 1997; LEÓN- REGAGNON & PAREDES, 2002), embora mais recentemente o uso de um fragmento parcial do 28S rDNA tem sido mais comum (HILDEBRAND *et al.*, 2015; PÉREZ-PONCE DE LEÓN *et al.*, 2015). Adicionalmente, os dois espaçadores transcritos internos, ITS1 e ITS2, são também amplamente utilizados, separadamente ou em combinação, na investigação taxonômica de espécies de trematódeos (NOLAN & CRIBB, 2005).

Os genes mitocondriais possuem várias vantagens sobre os nucleares, incluindo o uso para identificação em nível de espécie. Estão localizados dentro de cada organela mitocondrial dos trematódeos e é herdado maternamente (JANNOTTI-PASSOS *et al.*, 2001; LE *et al.*, 2002). Entre as vantagens do uso destes genes está a maior taxa de mutação em relação aos genes nucleares (BROWN *et al.*, 1979). Isso gera variação genética nos níveis populacional e de espécie (AVISE *et al.*, 1987). Entre esses genes está o *Cox1*, o qual é um gene codificador de proteínas altamente variável, sendo amplamente utilizado para sistemática molecular de metazoários (AVISE, 2000). outros marcadores de mtDNA são também informativos em estudos de famílias específicas de trematódeos. Entre estes, os mais utilizados são o gene da subunidade 1 da nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase 1 (*Nad-1*) (BRAY *et al.*, 1999, 2009; DETWILER *et al.*, 2010; CURRAN *et al.*, 2013; GEORGIEVA *et al.*, 2014; SELBACH *et al.*, 2014), o gene de rRNA de subunidade grande mitocondrial (*rrnL* ou 16S *rrn*) (LEUNG *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2010; HERRMANN *et al.*, 2014) e citocromo gene b (*cytb*) (ZHAO *et al.*, 2012).

É importante salientar que a escolha dos marcadores mais adequados em estudos moleculares de trematódeos é baseada no conhecimento prévio da família de trematódeos em estudo (HILLIS & DIXON, 1991). De fato, BLASCO-COSTA *et al.* (2016) sugerem uma escolha fundamentada nos marcadores para os quais já existem dados disponíveis nas bases de dados. Isso permite dar respostas às perguntas específicas envolvendo organismos em estudo.

Além disso, é sugerido explorar a variação no nível intraespecífico com um gene mitocondrial e usar uma região variável nuclear como o ITS (toda a região ITS1-5.8S-ITS2 ou apenas um dos espaçadores transcritos) ou 28S para a identificação de gêneros e famílias. Os dados genéticos fornecem aos pesquisadores uma tremenda capacidade de reconhecer espécies, iluminar a plasticidade fenotípica, vincular estágios do ciclo de vida, inferir filogenia e permitir uma exploração de variação geográfica (NOLAN & CRIBB, 2005).

#### 1.5- Larvas de trematódeos na América do Sul

Na América do Sul, já foram relatadas mais de 300 espécies de trematódeos adultos pertencentes às superfamílias Echinostomatoidea, Plagiorchioidea e Diplostomoidea (revisado por KOHN *et al.*, 2007; FERNANDES & KOHN, 2014; FERNANDES *et al.*, 2015). Apesar dessa diversidade de espécies relatadas, ainda muitas cercárias não foram identificadas como pertencentes a alguma espécie e a maioria dos ciclos biológicos permanecem com hospedeiros desconhecidos. Estudos ao longo dos tempos têm sido realizados nesta região, o que permitiram a elucidação de alguns ciclos biológicos de muitas larvas que ainda não tinham sido assignadas a alguma espécie em particular.

No Brasil, a partir dos trabalhos de PIRAJÁ-DA SILVA (1912), com o achado de larvas de *Schistosoma mansoni* (à época não associada a este parasito e descrita como *Cercaria blanchardi*), diversas contribuições foram realizadas por diferentes autores. De fato, cerca de 50 espécies de trematódeos foram identificadas a partir do estudo de larvas

TABELA 1. Principais tipos cercarianos encontrados em moluscos (PINTO &amp; MELO, 2013a)

<b>Tipos cercarianos</b>	<b>Possíveis famílias</b>	<b>Figura</b>
Cercariaeum	Brachylaimidae, Cyclocoelidae, Leucochloridiidae	A
Microcerca	Paragonimidae	B
Ropalocerca	Gorgoderidae	C
Monostoma	Notocotylidae e Pronocephalidae	D
Anfistoma	Superfamília Paramphistomoidea	E
Cistófora	Hemiuridae	F
Cistocerca	Gorgoderidae	G
Furcocistocerca	Azygiidae ou Bivesiculidae	H
Oftalmoxifidiocercária	Allocreadidae	I
Xifidiocercária		J-N
<i>Grupo Virgulata</i>	Lecithodendriidae	J
<i>Grupo Ornata</i>	Macroderididae e Haplometridae	K
<i>Grupo Armata</i>	Plagiorchiidae, Telorchiidae	L
<i>Grupo Ubiquita</i>	Microphallidae	M
<i>Grupo Microcotile</i>	Eumegacetidae	N
Equinóstoma	Echinostomatidae, Psilostomidae	N
Tricocerca	Fellostomidae, Lepocreadiidae	P
Pleurolofocerca	Cryptogonimidae, Heterophyidae, Opisthorchiidae	Q
Parapleurolofocerca	Heterophyidae (subfamília Haplorchiinae)	R
Megalura	Philophthalmidae	S
Gimnocéfala	Fasciolidae, Echinochasmidae	T
Gasterostoma	Bucephalidae	U
Transversotrematidae	Transversotrematidae	V
Distoma brevifurcada faringeada	Clinostomidae	W
Distoma brevifurcada faringeada com tronco caudal largo	Strigeidae	X
Monostoma brevifurcada afarinegada	Sanguinicolidae	Y
Distoma brevifurcada afarinegada	Schistosomatidae	Z,AA
Dicotoma	Gymnophalidae	AB
Distoma longifurcada faringeada	Diplostomidae e Strigeidae	AC
Monostoma longifurcada faringeada	Cyathocotylidae	AD

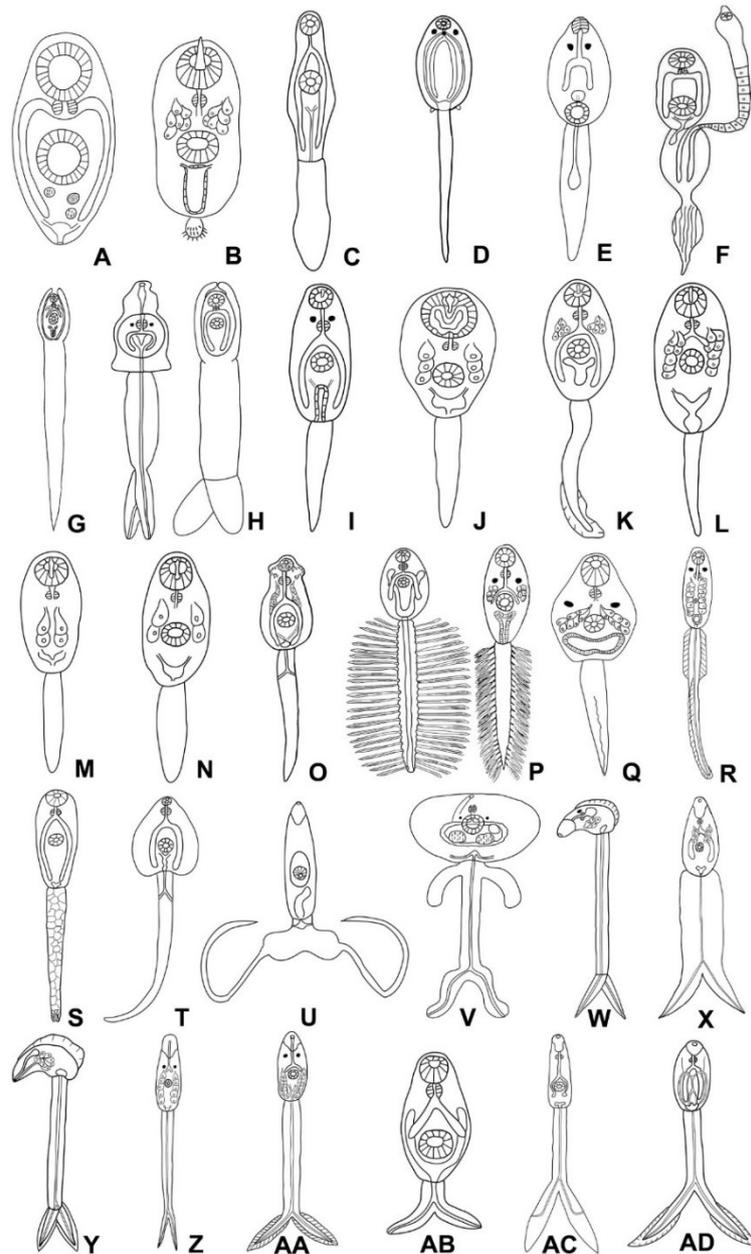


FIGURA 1. Principais tipos cercarianos encontrados em moluscos (PINTO & MELO, 2013a). (A) *Cercariaeum*; (B) *Microcerca*; (C) *Ropalocerca* (D) *Monostoma*; (E) *Anfistoma*; (F) *Cistófora*; (G) *Cistocerca*; (H) *Furcocistocerca*; (I) *Oftalmoxifidiocercária*; (J,N) *Xifidiocercária*; (J) Grupo *Virgulata*; (K) Grupo *Ornata*; (L) Grupo *Armata*; (M) Grupo *Ubiquita*; (N) Grupo *Microcotile*; (O) *Equinóstoma*; (P) *Tricocerca*; (Q) *Pleurolofocerca*; (R) *Parapleurolofocerca*; (S) *Megalura*; (T) *Gimnocéfala*; (U) *Gasterostoma*; (V) *Transversotrematidae*; (W) *Distoma brevifurcada* faringeada; (X) *Distoma brevifurcada* faringeada com tronco caudal largo; (Y) *Monostoma brevifurcada* afarinegada; (Z, AA) *Distoma brevifurcada* afarinegada; (AB) *Dicotoma*; (AC) *Distoma longifurcada* faringeada; (AD) *Monostoma longifurcada* faringeada. (PINTO & MELO, 2013a).

de trematódeos encontradas em moluscos no país. Uma diversidade ainda de larvas ainda não identificadas, descritas como *Cercaria* ou determinadas apenas como tipo cercarianos, também foram reportadas, em sua maioria, em moluscos vetores da esquistossomose (revisado por PINTO & MELO, 2013b). Apesar das interações já elucidadas, a maioria das espécies de trematódeos que ocorrem no Brasil permanece com ciclos biológicos e moluscos hospedeiros desconhecidos.

### 1.5.1- Estudos moleculares e larvas de trematódeos na América do Sul

O uso de ferramentas moleculares ganhou muita repercussão durante a última década, principalmente na Europa e América do Norte (GARCIA-VARELA *et al.*, 2015; AKSENOVA *et al.*, 2016; HERNÁNDEZ-MENA *et al.*, 2016; 2017; TKACH *et al.*, 2016; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017; SOKOLOV & SHCHENKOV, 2017; STOYANOV *et al.*, 2017). Isso, tem possibilitado a identificação e elucidação de novas interações biológicas entre trematódeos e seus hospedeiros.

Na América do Sul alguns esforços têm sido realizados, principalmente nos últimos cinco anos. A identificação de algumas espécies de trematódeos com o uso de marcadores como 28S, ITS1-5.8S-ITS2 e *Cox-1* foi alcançada, porém, isso ainda é pouco diante da alta diversidade destes parasitos relatados nesta região. Nesse contexto, ainda são necessários esforços para se aumentar o número de sequências de trematódeos nas bases de dados, visando a identificação por abordagem molecular das larvas de trematódeos encontradas em moluscos nesta região.

Atualmente na América do Sul, as ferramentas moleculares tem sido utilizadas com maior frequência na identificação de trematódeos, tanto em adultos (MAGALHÃES *et al.*, 2004; JANNOTTI-PASSOS *et al.*, 2006; MUÑOZ *et al.*, 2012; FIGUEIRA *et al.*, 2014; CREMONTE *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2018; ASSIS *et al.*, 2019; ALVES *et al.*, 2020) quanto em larvas encontradas nos diferentes 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; DELLAGNOLA *et al.*, 2019; LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2018; 2019; QUEIROZ *et al.*, 2019; 2021). Apesar disso, ainda são necessários esforços para ampliar o conhecimento de uma parcela maior da rica fauna de trematódeos que ocorre neste continente.

## 2- JUSTIFICATIVA

Apesar da diversidade de trematódeos das superfamílias Diplostomoidea, Echinostomatoidea e Plagiorchioidea relatados em vertebrados no Brasil, a maioria continua com moluscos transmissores e ciclos biológicos desconhecidos. Em contrapartida, uma diversidade de tipos cercarianos associados a estas superfamílias têm sido comumente verificada em moluscos aquáticos no país. Contudo, a associação destes estágios larvais aos estágios adultos não é, na maioria das vezes, possível através de estudos morfológico. Apesar do uso de ferramentas moleculares para o estudo de trematódeos ter resultado em avanços no conhecimento destes parasitos nos últimos anos, o uso desta abordagem pode ser considerado incipiente no Brasil. Este fato contrasta com a ampla diversidade dos potenciais hospedeiros e trematódeos já registrados no país. Associado a isso, a complexidade inerente aos ciclos biológicos destes parasitos dificulta a realização de estudos utilizando a abordagem experimental clássica. Isso justifica a realização de estudos taxonômicos integrativos visando à identificação de larvas de trematódeos. Este tipo de estudo pode elucidar novos ciclos biológicos de trematódeos no país, o que pode ser considerado um conhecimento básico necessário, inclusive para direcionar futuras estratégias de controle de espécies com potencial importância médico-veterinária.

### 3- OBJETIVOS

#### 3.1- Objetivo geral

Identificar através do uso da taxonomia integrativa, larvas de trematódeos das superfamílias Echinostomatoidea, Plagiorchioidea e Diplostomoidea encontradas em moluscos dulceaquícolas no Brasil.

#### 3.2- Objetivos específicos

- a) Avaliar a infecção natural de moluscos dulceaquícolas por larvas de trematódeos das superfamílias, Echinostomatoidea, Plagiorchioidea e Diplostomoidea no Brasil.
- b) Realizar o estudo morfológico das cercárias obtidas.
- c) Desenvolver estudos experimentais visando a obtenção de outros estágios evolutivos (metacercárias e parasitos adultos).
- d) Caracterizar por meio de sequências nucleotídicas (28S, ITS1-5.8S-ITS2, *Cox-1* e/ou *Nad-1*) e análises filogenéticas, amostras de larvas de trematódeos das superfamílias Echinostomatoidea, Plagiorchioidea e Diplostomoidea encontradas em moluscos de diferentes localidades do Brasil.
- e) Identificar, até a menor categoria taxonômica possível, larvas de trematódeos das superfamílias Echinostomatoidea, Plagiorchioidea e Diplostomoidea encontradas em moluscos do Brasil.

## 4- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- Amostras estudadas

As amostras avaliadas no presente estudo correspondem a larvas do tipo gimnocéfala, equinóstoma, xifidiocercária e estrigeocercária, emergidas de moluscos oriundos de coleções aquáticas de localidades dos estados de Minas Gerais, Maranhão e Rio de Janeiro. O conjunto de amostras é composto por amostras previamente coletadas e amostras obtidas através de novas coletas malacológicas realizadas para o presente trabalho, conforme apresentado a seguir.

#### *4.1.1- Amostras previamente coletadas (2014-2019)*

Este material é composto por 35 amostras de cercárias pertencentes às superfamílias Echinostomatoidea, Plagiorchioidea e Diplostomoidea. Parte deste material (11 amostras) é oriundo de um trabalho colaborativo com o Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, baseado na análise de moluscos coletados em localidades dos estados Minas Gerais, Maranhão e Rio de Janeiro entre 2014 e 2016. As demais amostras foram obtidas durante atividades de campo ocasionais previamente realizadas pela equipe do laboratório em diferentes localidades do estado de Minas Gerais. As informações sobre estas amostras como tipo cercarianos, moluscos hospedeiro intermediário e localidades, são apresentadas na Tabela 2.

#### *4.1.2- Amostras obtidas através de novas coletas malacológicas (2018-2019)*

Novas amostragens de moluscos e avaliação da infecção por trematódeos foram realizadas em coleções aquáticas (lagoas e riachos) de Belo Horizonte, Contagem, Januária, Esmeraldas e Betim, no estado de Minas Gerais. As coletas malacológicas foram realizadas entre outubro de 2018 e agosto de 2019 (Tabela 3).

TABELA 2- Amostras de trematódeos pertencentes às superfamílias Echinostomatoidea, Plagiorchioidea e Diplostomoidea previamente coletadas e utilizadas para análises morfológica e/ou molecular

Nº	TIPO CERCARIANO	HOSPEDEIRO	LOCALIDADE
1	Xifidiocercária	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Rio de Janeiro
2	Xifidiocercária	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Rio de Janeiro
3	Xifidiocercária	<i>Pseudosuccinea columella</i>	Minas Gerais
4	Xifidiocercária	<i>Pomacea</i> sp.	Minas Gerais
5	Xifidiocercária	<i>Biomphalaria</i>	Rio de Janeiro
6	Xifidiocercária	<i>Pomacea</i> sp.	Minas Gerais
7	Xifidiocercária	<i>Biomphalaria</i> sp.	Maranhão
8	Xifidiocercária	<i>Pseudosuccinea columella</i>	Minas Gerais
9	Xifidiocercária	<i>Pomacea</i> sp.	Minas Gerais
10	Xifidiocercária	<i>Pomacea</i> sp.	Minas Gerais
11	Xifidiocercária	<i>Pseudosuccinea columella</i>	Minas Gerais
12	Equinóstoma	<i>Biomphalaria</i> sp.	Rio de Janeiro
13	Gimnocéfala	<i>Pomacea</i> sp.	Maranhão
14	Equinóstoma	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Maranhão
15	Equinóstoma	<i>Biomphalaria straminea</i>	Minas Gerais
16	Equinóstoma	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Minas Gerais
17	Equinóstoma	<i>Drepanotrema</i> sp.	Minas Gerais
18	Equinóstoma	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Minas Gerais
19	Equinóstoma	<i>Biomphalaria</i> sp.	Minas Gerais
20	Equinóstoma	<i>Biomphalaria straminea</i>	Minas Gerais
21	Equinóstoma	<i>Biomphalaria</i>	Rio de Janeiro
22	Equinóstoma	<i>Biomphalaria</i> sp.	Rio de Janeiro
23	Equinóstoma	<i>Biomphalaria straminea</i>	Minas Gerais
24	Equinóstoma	<i>Drepanotrema</i> sp.	Minas Gerais
25	Equinóstoma	<i>Gundlachia ticaga</i>	Minas Gerais
26	Equinóstoma	<i>Pomacea</i> sp.	Minas Gerais
27	Xifidiocercária	<i>Stenophysa marmorata</i>	Minas Gerais
28	Equinóstoma	<i>Biomphalaria</i> sp.	Minas Gerais
29	Equinóstoma	<i>Biomphalaria</i> sp.	Rio de Janeiro
30	Equinóstoma	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Minas Gerais
31	Equinóstoma	<i>Biomphalaria straminea</i>	Minas Gerais
32	Equinóstoma	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Minas Gerais
33	Equinóstoma	<i>Biomphalaria straminea</i>	Minas Gerais
34	Estrigeocercária	<i>Drepanotrema</i> sp.	Minas Gerais
35	Estrigeocercária	<i>Drepanotrema</i> sp.	Minas Gerais

TABELA 3- Exemplos de moluscos coletados e infectados por cercárias durante coletas malacológicas realizadas em cinco coleções aquáticas de Minas Gerais, entre os meses de agosto de 2018 e agosto de 2019. Abreviaturas: EQ: Equinóstoma; EST: Estrigeocercária; OTC: Outros tipos cercarianos

N° de coleta	Data	Localidade	Tipo de ambiente	Coordenadas geográficas	Moluscos	Coletados	Infectados		
							EQ	EST	OTC
1	08/08/2018	Belo Horizonte	Lagoa	19°53' 40.815"S 43° 54' 52.011"W	<i>Physella acuta</i>	188			
2	22/10/2018	Belo Horizonte	Lagoa	19° 53' 40.815"S 43° 54' 52.011"W	<i>Physella acuta</i>	140			
3	19/03/2019	Betim	Lagoa	19°54'35.1''S 44°10'05.5''W	<i>Pseudosuccinea columella</i>	3	17		
					<i>Biomphalaria straminea</i>	118			
					<i>Pomacea</i> sp.	61			
					<i>Melanoides tuberculata</i>	5			
4	28/04/2019	Contagem	Lagoa	19°53'43.4''S 44°08'34.4''W	<i>Stenophysa marmorata</i>	10	69	5	25
					<i>Biomphalaria straminea</i>	700			
					<i>Pomacea</i> sp.	38			
					<i>Melanoides tuberculata</i>	4			
					<i>Stenophysa marmorata</i>	64			
5	12/06/2019	Betim	Lagoa	19° 58' 16.319"S 44° 16' 8.95"W	<i>Drepanotrema</i> sp.	1	1		
					<i>Biomphalaria occidentalis</i>	55			
					<i>Pomacea</i> sp.	26			
					<i>Pseudosuccinea columella</i>	2			
					Ancylidae	7			
6	21/07/2019	Contagem	Lagoa	19°54'01.7''S 44°08'59.5''W	<i>Biomphalaria straminea</i>	9	1		
					<i>Melanoides tuberculata</i>	12			
					Bivalves	9			
7	08/08/2019	Esmeraldas	Lagoa	18°59'58.13"S 43°59'47.061"W	<i>Drepanotrema lucidum</i>	1			

				<i>Biomphalaria</i> sp.	83		
				<i>Biomphalaria tuberculata</i>	93		
				<i>Stenophysa marmorata</i>	2		
				<i>Pseudosuccinea columella</i>	1		
				Ancylinae	3		
8	28/08/2019	Januária	Riacho	15° 29' 44.16" S 45° 14' 12.616" W	<i>Biomphalaria glabrata</i>	90	1
				<i>Drepanotrema lucidum</i>	2		1

#### 4.2- 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 e 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 e avaliados quanto a infecção por larvas de trematódeos. Parte dos moluscos coletados foram utilizados para a identificação taxonômica segundo critérios morfológicos (conquiliologia ou anatomia interna, dependendo do caso) segundo diferentes autores (PARAENSE, 1975; SIMONE, 2006).

#### 4.3- Avaliação da infecção por larvas de trematódeos

As amostras de moluscos obtidas foram colocadas 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 (FERNANDES *et al.*, 2003). 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. Para a obtenção dos estágios de rédias, os moluscos foram prensados entre lâminas de vidro e observados ao microscópio estereoscópico.

#### 4.4- Estudos experimentais

Algumas cercárias que foram coletadas previamente 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). O acesso ao patrimônio genético foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).

#### 4.4.1- Obtenção experimental de metacercárias

Cercárias do tipo equinóstoma e estrigeocercária emergidas de moluscos foram utilizadas para a infecção de peixes e 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 até o fim dos experimentos.

Visando avaliar o sucesso da infecção experimental, os peixes foram eutanasiados (7-15 DAI, dependendo da espécie de parasito) por imersão em solução de hidrócloro 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 examinados em microscópio estereoscópico para a pesquisa das metacercárias. No caso da infecção experimental de moluscos, estes foram prensados entre lâminas de vidro e examinados em estereomicroscópio.

#### 4.5- Estudo morfológico dos estágios evolutivos

Em ambos os tipos de amostras (previamente coletadas e novas amostras), as 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%. 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 de metacercárias foram obtidas através de espécimes vivos e foram tabuladas e analisadas em software Microsoft® Excel 2010. As fotografias foram obtidas com câmera digital Leica ICC50 HD, acoplada ao microscópio Leica ICC50HD. As medidas estão apresentadas em micrômetros, sendo

fornecidas pela média, seguida pelo desvio-padrão e amplitude entre parênteses.

#### 4.6- Estudo molecular

##### 4.6.1- *Fixação das cercárias*

As amostras de cercárias pertencentes às três superfamílias avaliadas, 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. Além disso, para as amostras provenientes de novas coletas foram fixados (quando possível), rédias e esporocistos para garantir uma maior quantidade de DNA.

##### 4.6.2- *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 ou com rédias ou esporocistos) foi utilizado o kit Wizard® Genomic DNA Purification. Para amostras com menor quantidade de larvas foi utilizado o kit QIAamp® DNA micro kit. As etapas envolvidas na extração foram realizadas seguindo-se as instruções dos fabricantes. O DNA extraído foi dosado através da avaliação da absorbância em 260nm em espectrofotômetro de microvolume NanoDrop™ Lite. Para determinação da pureza do DNA extraído, determinou-se a relação da absorbância obtidas nos comprimentos de onda 260nm e 280 nm.

##### 4.6.3- *Amplificação do DNA*

Foram utilizados quatro marcadores moleculares para o estudo das amostras avaliadas. As regiões genéticas avaliadas, os primers e condições de PCR utilizados são apresentados na Tabela 4. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl, que incluiu 12,5 µl de Platinum Hot Start PCR Master Mix, 1,25 pmol de cada primer e cerca de 50 ng de DNA molde. Para a visualização dos produtos de amplificação, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% corado com Unisafe Dye® Nucleic Acid Staining Solution (20.000x) na quantidade de 1,5µl para cada 30ml de tampão Triacetato-EDTA (TAE) 0,5M. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado pela

comparação com padrão de pesos moleculares.

#### 4.6.4- 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). O produto de PCR (23  $\mu$ L, 2  $\mu$ L são usados na eletroforese) foi transferido para tubo eppendorf de 1 mL, adicionando-se em seguida PEG na mesma quantidade. Em seguida, o tubo foi homogeneizado em vórtex por 1 minuto e, incubado em banho seco a 37°C por 15 minutos. Após esta etapa, realizou-se centrifugação por 15 min a 13.000 rpm, sendo o sobrenadante descartado. Posteriormente, foram adicionados 125  $\mu$ L de etanol 80% refrigerado, e uma nova centrifugação (5 min a 13.000 rpm) e descarte de sobrenadante realizados. Este último passo foi repetido mais uma vez. A última etapa do protocolo consistiu em manter o tubo a temperatura ambiente até a evaporação de todo o etanol. O DNA precipitado assim obtido foi ressuspenso em 20  $\mu$ L de água ultrapura e dosado em NanoDrop™ Lite.

#### 4.6.5- Sequenciamento de DNA

Os produtos da PCR purificados foram, na maioria das vezes, sequenciados com os mesmos primers mencionados para a amplificação. No caso dos *amplicons* obtidos com os primers Dice 1 e Dice 11, foram utilizados para o sequenciamento os primers T3(F) e T7(R) (Tabela 4), de acordo com VAN STEENKISTE *et al.* (2015). Parte das amostras 28S foram também sequenciadas utilizando-se primers internos (300F e ECD2R). As amostras foram preparadas para o sequenciamento segundo as recomendações das empresas em que esta etapa foi realizada [Myleus Biotechnology (Belo Horizonte, MG, Brasil; (<https://www.myleus.com/>) ou ACTGene (Alvorada, RS; <https://actgene.com.br/>)]. O sequenciamento ocorreu por eletroforese capilar com o sequenciador automático ABI3730, utilizando-se polímero BigDye v3.1 e POP7.

#### 4.6.6 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 usando MUSCLE com sequências depositadas no GenBank, com auxílio do programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018). Foram consideradas as sequências cogenéticas e as pertencentes ao gênero mais próximo. Os modelos evolutivos utilizados para a construção das árvores filogenéticas nas duas análises, foram determinados por Bayesian information criterion (BIC) no programa MEGA X. A seleção dos grupos externos baseou-se nas filogenias publicada por OLSON *et al.* (2003) e TKACH *et al.* (2016). As análises filogenéticas foram realizadas pelos métodos de Máxima Verossimilhança (MV) (FELSENSTEIN, 1981) e Inferência Bayesiana (IB). As árvores MV foram geradas no MEGA X, sendo a robustez dos ramos das árvores geradas medida pela utilização do teste *bootstrap* com 1000 repetições para avaliar. As análises de IB foram realizadas em MrBayes v.3.2.6 (RONQUIST *et al.*, 2012) usando a análise de cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) em duas execuções simultâneas de quatro cadeias por 1.000.000 de gerações e amostragem a cada 100 gerações. O suporte dos nós foi fornecido pela probabilidade posterior. Para a visualização das árvores foi utilizado o programa FigTree v.1.4.2. Para fins de apresentação das filogenias, utilizou-se a árvore inferida por inferência bayesiana, sendo os suportes dos nós representado por símbolos (triângulo para *bootstrap* obtido na MV e quadrado para probabilidade posterior para IB) em escala de cor indicada nas figuras. Um esquema geral representativo do fluxo da análise morfológica e molecular das amostras avaliadas no presente estudo é apresentado na Figura 2.

#### 4.7- Identificação taxonômica

A identificação de cada uma das larvas foi realizada até a menor categoria taxonômica possível. O primeiro passo foi a identificação do tipo cercariano através da morfologia das larvas, resultando na determinação da superfamília e possíveis famílias. Posteriormente, as sequências de cada larva foram submetidas à análise de similaridade no BLAST. As sequências que apresentavam maiores similaridades foram usadas para a construção de alinhamentos, que foram utilizados para o cálculo de divergências

nucleotídicas e filogenias visando a determinação mais assertiva da família, gênero ou espécie, quando possível.

#### 4.8- Delimitação de espécies

Em alguns casos, nos quais as divergências genéticas não estabeleciam uma diferenciação intraespecífica clara, foram usadas as análises do Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP) (PUIILLANDRE *et al.*, 2019), (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/>) para estabelecer a delimitação de algumas espécies. Nestes casos específicos, foi usado o alinhamento do marcador mitocondrial *Nad-1* como parâmetro de entrada e padrão para as métricas de três distâncias disponíveis (Jukes-Cantor JC69, Kimura K80 e distância p). Finalmente, foi considerada apenas a partição que apresentou a pontuação ASAP mais baixa para cada métrica.

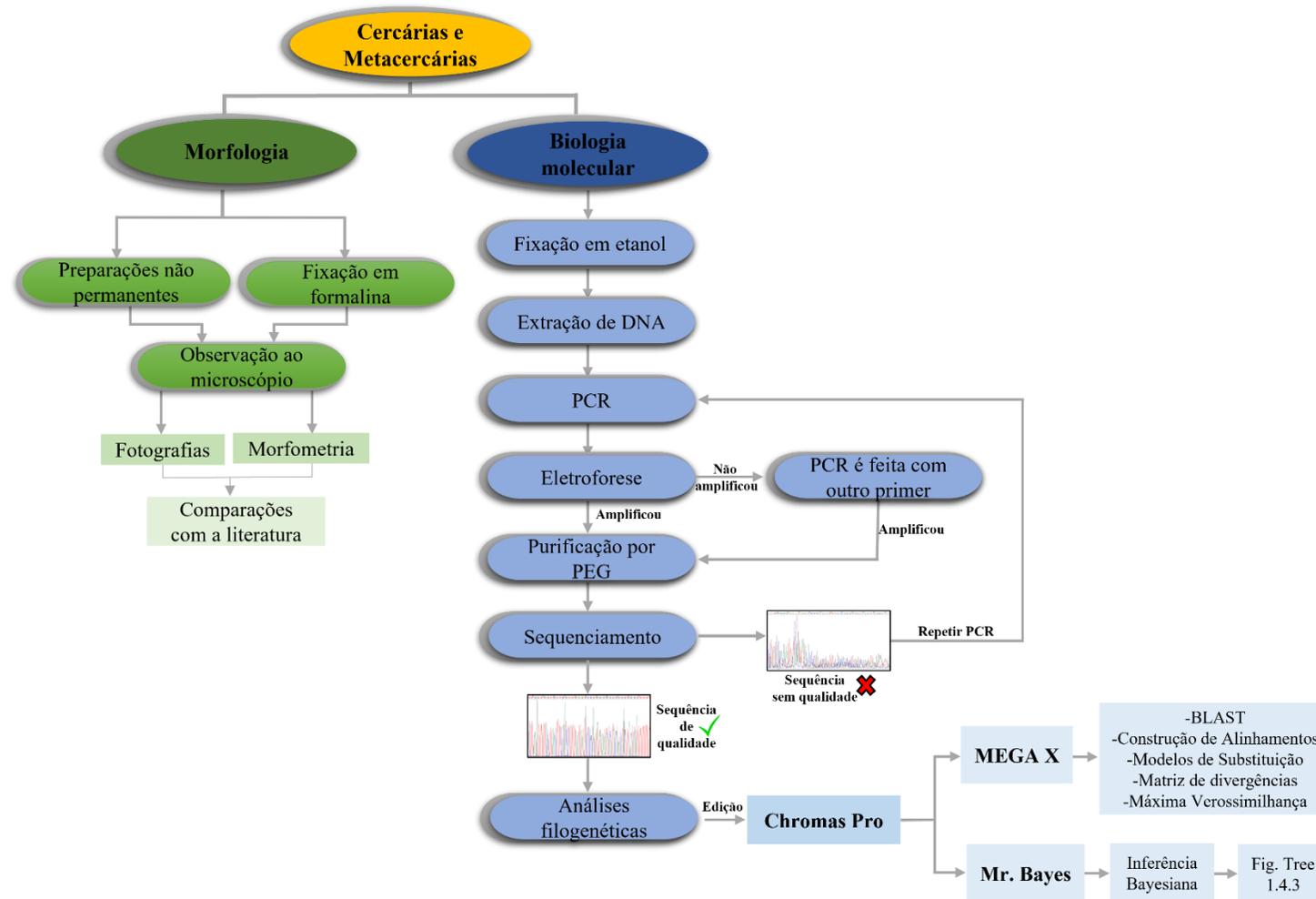


FIGURA 2- Esquema representativo do fluxo das análises morfológica e molecular das amostras de larvas de trematódeos avaliadas no presente estudo.

TABELA 4- Primers utilizados para a amplificação de fragmentos dos genes 28S, ITS1-5.8S-ITS2, *Cox 1* e *Nad-1*

Primer	Sequência 5'-3'	Tamanho do fragmento (pb)	Uso	Condições da PCR	Referência
<b>28S</b>					
Dig12 1500R	AAG CAT ATC ACT AAG CGG GCTATCCTGAGGGAAACTTCG	1200	PCR/seq.	94°C por 2 min; 40 ciclos: 94°C por 30s; 56°C por 30s, 72°C por 2 min; 72°C por 7 min	Tkach <i>et al.</i> , 2003
300F	CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG		seq.		Littlewood & Olson, 2001
ECD2R	CTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG		seq.		Littlewood <i>et al.</i> , 1997
<b>ITS1-5.8S-ITS2</b>					
BD1 BD2	TCTAGATGCGTTCGAAGTGTCGATG TATGCTTAAATTCAGCGGGT	1000	PCR/seq.	94°C por 2 min; 35 ciclos: 94°C por 30s, 50°C por 30s, 72° por 10 min	Luton <i>et al.</i> , 1992
D1 D2	AGGAATTCCTGGTAAGTGCAAG CGTTACTGAGGGAATCCTGG	1100	PCR/seq.	94 °C por 2min; 35 ciclos: 94 °C por 30s, 50 °C por 30s, 72 °C por 10 min	Galazzo <i>et al.</i> , 2002
<b><i>Cox-1</i></b>					
JB3 COI-RTrema	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT CAACAAATCATGATGCAAAAGG	800	PCR/seq.	94°C por 2 min; 35 ciclos: 94°C por 30s, 45°C por 30s, 72°C por 60s; 35 ciclos de 94°C por 60s; 72°C por 7min.	Miura <i>et al.</i> , 2005
JB4.5	AGCACCTAAACTTAAAACATAATGAAA			3 min a 94°C 30 ciclos: 45 s 92°C, 45 s 45°C, e 1:30 s 72°C, 10 min at 72°C	Martinez-Salazar <i>et al.</i> , 2016
Dice 1	ATTAACCCTCACTAAATTWCNTTRGATC ATAAG	600	PCR	94°c por 2min; 3 ciclos de 94°C por 40s, 51°C por 40s,	Van Steenkiste <i>et al.</i> , 2015

Dice 11	TAATACGACTCACTATAGCWGWACHA AATTHCGATC		PCR e seq.	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	
BarCox-R	ATAAACCTCAGGATGCCCAAAAAA	600	PCR e seq.	Mesmas condições que	López-Caballero <i>et al.</i> , 2019
T3	ATTACCCCTCACTAAA	600	seq.		
T7	TAATACGACTCACTATA		seq.		
<b><i>Nad-1</i></b>					
NDJ1	AGATTCGTAAGGGGCCTAATA	400	PCR/seq	95°C por 5 min; 35 ciclos de	Morgan & Blair, 1998
NDJ2	CTTCAGCCTCAGCATAAT			30s cada a 94°C; 48°C por 20s, 72°C por 45s, 72°C por 4 min.	
JB11	AGATTCGTAAAGGGGCCTAATA	500	PCR/seq	40 ciclos de: 30s 94 °C; 30s	Bowles & McManus, 1993
JB12	ACCACTAACTAATTCAC TTTC			a 50 °C; 60s a 72 °C	

Seq.: Sequenciamento

PCR: Reação em cadeia da Polimerase

## 5.- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo morfológico e molecular das amostras de larvas de trematódeos analisadas até o momento possibilitou a identificação, até o menor nível taxonômico possível, de 20 espécies pertencentes a 15 gêneros e 8 famílias incluídas nas três superfamílias foco do presente trabalho. Com relação ao estudo molecular, um total de 67 sequências nucleotídicas de quatro diferentes marcadores moleculares amplamente utilizados no estudo taxonômico de trematódeos foram obtidas [28S (24 sequências), ITS1-5.8S-ITS2 (17 sequências) *Cox-1* (9 sequências) e *Nad-1* (17 sequências)] (Anexo 1). Visando uma melhor organização da apresentação, as informações obtidas para cada espécie serão apresentadas em três capítulos referentes a cada superfamília foco do estudo. O primeiro contempla larvas de 12 espécies pertencentes à superfamília Echinostomatoidea. No segundo capítulo, são consideradas as larvas de 5 espécies incluídas na superfamília Plagiorchioidea. Finalmente, 3 espécies de trematódeos pertencentes à superfamília Diplostomoidea são apresentadas no capítulo 3.

## 5.1- CAPÍTULO 1: Larvas de trematódeos da superfamília Echinostomatoidea encontradas em moluscos do Brasil

### 5.1.1- Revisão da literatura

A superfamília Echinostomatoidea Looss, 1899 é constituída por um grupo diverso de trematódeos globalmente distribuídos. Quando adultos, são encontrados em vertebrados de todas as classes, com uma riqueza de espécies particularmente alta em aves (KOSTADINOVA *et al.*, 2005). Esta superfamília inclui atualmente nove famílias e 105 gêneros (TKACH *et al.*, 2016). Sabe-se que algumas espécies de Echinostomatoidea causam doenças em seres humanos, como a equinostomose, trematodíase intestinal endêmica principalmente no sudeste da Ásia, onde os segundos hospedeiros intermediários (peixes e moluscos) são consumidos crus ou mal-cozidos (GRACZYK & FRIED, 1998). Além disso, várias espécies destes trematódeos possuem importância veterinária, como por exemplo *Fasciola hepatica* L., parasito hepático associado a graves doenças no gado e prejuízos à pecuária (BYRNE *et al.*, 2016), espécies do gênero *Philophthalmus* Looss, 1899, parasitos oculares associados a alterações patológicas que podem causar cegueira em aves (MUKARATIRWA *et al.*, 2005; CHURCH *et al.*, 2013; ROJAS *et al.*, 2013), e espécies da família Cyclocoelidae, parasitos das vias respiratórias de aves domésticas (PETROCHENKO & KOTELNIKOV, 1963). Destaca-se que a importância ecológica desta superfamília de trematódeos é notória, podendo ser exemplificada com a associação de *Ribeiroia ondatrae* (Price, 1931) com a ocorrência de má formação e redução de populações de anfíbios na América do Norte (JOHNSON *et al.*, 2002; 2004; 2009).

As associações entre Echinostomatoidea e moluscos aquáticos (primeiros hospedeiros intermediários) (FRIED & TOLEDO, 2009), seguem um padrão de associação. TKACH *et al.* (2016) através de análises filogenéticas do grupo, evidenciaram que parasitos de famílias mais basais como Echinochasmidae, Psilostomidae, Himasthlidae e Philophthalmidae, evoluíram em associação com cenogastrópodes, enquanto as famílias mais derivadas evoluíram para utilizar panpulmonados de água doce, com algumas poucas exceções verificadas em algumas espécies de *Echinostoma*, *Echinoparyphium* e *Neoacanthoparyphium*.

Com relação à morfologia, as cercárias de Echinostomatoidea podem ser classificadas em dois grandes tipos cercarianos: larvas do tipo equinóstoma (com colar

cefálico, contendo ou não espinhos) e gimnocéfala (sem colar cefálico) (SCHELL, 1975, 1985). No geral, as cercárias dos representantes desta superfamília são caracterizadas por apresentarem cauda simples (com ou sem membrana natatória); no corpo, são observadas glândulas cistogênicas com conteúdo em barras ou granular. Além disso, geralmente apresentam corpúsculos calcários nos canais excretores principais (em casos raros, podem estar ausentes) e vários grupos possuem um colar de espinhos, cujo número e disposição, na maioria das vezes, são os mesmos verificados nos adultos (FRIED & TOLEDO, 2009; OSTROWSKI DE NÚÑEZ & HAMANN, 2013).

Na América do Sul, mais de 125 espécies pertencentes à superfamília Echinostomatoidea já foram relatadas, em seu estágio adulto, em diferentes classes de vertebrados (compilado por KOHN *et al.*, 2007; FERNANDES & KOHN, 2014; FERNANDES *et al.*, 2015). Porém, no que se refere às fases larvais, as informações existentes são relativamente escassas. Estudos experimentais realizados a partir de larvas encontradas em moluscos coletados em alguns países da América do Sul (Argentina, Brasil, Colômbia, Uruguai e Venezuela) possibilitaram a elucidação do ciclo biológico de 30 espécies pertencentes a 5 famílias de Echinostomatoidea. Além disso, larvas de Echinostomatoidea encontradas em moluscos na América do Sul foram descritas como pertencentes aos gêneros coletivos *Cercaria* Müller, 1774, *Echinocercaria* Lamark, 1815, ou identificadas em nível de família (Tabela 5). Estas larvas foram relatadas em pelo menos 32 diferentes espécies de moluscos.

Estudos moleculares envolvendo espécies de Echinostomatoidea são bastante escassos na região neotropical. A ausência de sequências referência obtidas de adultos impossibilita a identificação específica de estágios larvais. Contudo, a determinação de gênero ou família do parasito em estudo por análises filogenéticas já pode ser considerado um avanço significativo (SELBACH *et al.*, 2014; DELLAGNOLA *et al.*, 2019; LAIDEMITT *et al.*, 2019). Na América do Sul, os estudos envolvendo a obtenção de sequências moleculares a partir de larvas de Echinostomatoidea são recentes. Os trabalhos existentes envolveram a análise de espécies dos gêneros *Neopetasiger*, *Ribeiroia* e *Drepanocephalus* (PINTO *et al.*, 2013a; 2013b; DAVIES *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2016). Apesar destes avanços, a maioria dos ciclos biológicos e moluscos transmissores das espécies desta superfamília ainda permanecem desconhecidos. A contribuição de ferramentas moleculares para o avanço no conhecimento de novas interações biológicas envolvendo estes trematódeos e moluscos é evidenciado pelos resultados apresentados a seguir.

TABELA 5. Cercárias do tipo equinóstoma e gimnocéfala encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul

Espécie	Molusco	Localidade	Fig.	Referência
			<b>Fig. 3</b>	
Cercaria Echinostomatidae Nº 1	<i>Biomphalaria straminea</i> ; <i>Biomphalaria tenagophila</i>	Argentina	<b>a</b>	Martorelli <i>et al.</i> (2013)
Cercaria Echinostomatidae Nº 2	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Argentina	<b>b</b>	Martorelli <i>et al.</i> (2013)
Cercaria Echinostomatidae Nº 3	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Argentina	<b>c</b>	Martorelli <i>et al.</i> (2013)
Cercaria Echinostomatidae Nº 4	<i>Biomphalaria straminea</i> ; <i>Biomphalaria tenagophila</i>	Argentina	<b>d</b>	Martorelli <i>et al.</i> (2013)
<i>Cercaria heleobicola IV</i>	<i>Heleobia conexa</i>	Argentina	<b>e</b>	Martorelli (1990)
<i>Cercaria heleobicola V</i>	<i>Heleobia conexa</i>	Argentina	<b>f</b>	Martorelli (1990)
<i>Cercaria macrogranulosa</i>	<i>Biomphalaria straminea</i>	Argentina	<b>g</b>	Ostrowski de Núñez <i>et al.</i> (1990)
<i>Cercaria Ribeiroia</i> sp.	<i>Biomphalaria occidentalis</i>	Argentina	<b>h</b>	Ostrowski de Núñez <i>et al.</i> (1991); Fernández <i>et al.</i> (2016)
Ciclocoelidae	<i>Chilina parchappii</i>	Argentina	**	Szidat (1963)
Echinocercaria I	<i>Chilina dombeyana</i>	Argentina	**	Flores & Semenas (2008)
Echinocercaria III	<i>Chilina dombeyana</i>	Argentina	**	Flores & Semenas (2008)
Echinocercaria IV	<i>Chilina dombeyana</i>	Argentina	**	Flores & Semenas (2008)
Echinocercaria sp.	<i>Chilina</i> sp.	Argentina	<b>i</b>	Ostrowski de Núñez e Quaggiotto (1995)
Echinocercaria gen. sp. 1	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Argentina	<b>j</b>	Parietti <i>et al.</i> (2015)
Echinocercaria sp. I	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Argentina	<b>k</b>	Ostrowski de Núñez (1981b)
Echinocercaria sp. II	<i>Biomphalaria straminea</i>	Argentina	<b>l</b>	Ostrowski de Núñez <i>et al.</i> (1990)
Echinocercaria sp. III	<i>Biomphalaria occidentalis</i>	Argentina	<b>m</b>	Ostrowski de Núñez <i>et al.</i> (1991)
Echinocercaria sp. IV	<i>Biomphalaria orbignyi</i> ; <i>peregrina</i> ; <i>B. straminea</i>	<i>B.</i> Argentina	<b>n</b>	Ostrowski de Núñez <i>et al.</i> (1997)

TABELA 5: *Continuação...*

Echinocercaria sp. V	<i>Biomphalaria orbigny</i>	Argentina	<b>o</b>	Ostrowski de Núñez <i>et al.</i> (1997)
Echinocercaria sp. VII	<i>Biomphalaria occidentalis</i>	Argentina	<b>P</b>	Ostrowski de Núñez <i>et al.</i> (1991)
Echinocercaria sp. XIII	<i>Biomphalaria straminea</i>	Argentina	<b>q</b>	Fernández <i>et al.</i> (2014)
Echinocercaria sp. XIV	<i>Biomphalaria straminea</i>	Argentina	<b>r</b>	Fernández <i>et al.</i> (2014; 2016)
Echinocercaria sp. XVI	<i>Biomphalaria occidentalis</i> ; <i>B. straminea</i>	Argentina	<b>s</b>	Fernández <i>et al.</i> (2014)
<b>Fig. 4</b>				
Echinocercaria sp. 1	<i>Biomphalaria straminea</i>	Argentina	<b>a</b>	Fernández <i>et al.</i> (2016)
Echinocercaria sp. 2	<i>Biomphalaria straminea</i>	Argentina	<b>b</b>	Fernández <i>et al.</i> (2016)
Echinocercaria sp. 3	<i>Biomphalaria occidentalis</i>	Argentina	<b>c</b>	Fernández <i>et al.</i> (2016)
<i>Echinochasmus</i> sp.	<i>Asolene platae</i>	Argentina	<b>d</b>	Dellagnola <i>et al.</i> 2019
<i>Echinoparyphium megacirrus</i>	<i>Chilina dombeiana</i>	Argentina	**	Semenas <i>et al.</i> (1999); Flores <i>et al.</i> (2010); Flores & Semenas (2016)
<i>Echinoparyphium</i> sp.	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Argentina	**	Flores <i>et al.</i> (2010)
<i>Echinochasmus talaensis</i>	<i>Heleobia parchappii</i>	Argentina	<b>e</b>	Martorelli (1985)
		Argentina	**	Parietti <i>et al.</i> (2013); Etchegoin & Martorelli, (1998); Merlo <i>et al.</i> (2019); Parietti <i>et al.</i> (2020)
Echinostomatoidea sp. 1	<i>Heleobia australis</i>			
<i>Echinostoma parcespinosum</i>	<i>Pomacea canaliculata</i>	Argentina	<b>f</b>	Martorelli (1987)
<i>Episthmium suspensum</i>	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Argentina	<b>g</b>	Ostrowski de Núñez (1974)
Gimnocephala sp. I	<i>Heleobia piscium</i>	Argentina	<b>h</b>	Ostrowski de Núñez (1975)
Gimnocephala sp. II	<i>Uncancilus concentricus</i>	Argentina	<b>i</b>	Ostrowski de Núñez (1981a)
<i>Himasthla</i> sp.	<i>Helobia australis</i>	Argentina	<b>j</b>	Alda & Martorelli (2014)
	<i>B. glabrata</i> ; <i>B. tenagophila</i> ; <i>B. straminea</i>	Argentina	**	Ostrowski de Núñez & Hamann (2013)
<i>Paryphostomum segregatum</i>	<i>Helobia australis</i>		**	Alda & Martorelli (2014); Parietti <i>et al.</i> (2013)
<i>Psilochasmus oxyurus</i>	<i>Heleobia parchappii</i>	Argentina	<b>k</b>	Ostrowski de Núñez & Quintana (2008)

TABELA 5: Continuação...

<i>Stephanoprora uruguayensis</i>	<i>Aylacostoma chloroticum</i>	Argentina	<b>l</b>	Ostrowski de Núñez (2007)
<i>Cercaria echinostoma</i> 1	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Brasil	<b>m</b>	Veitenheimer-Mendes (1982)
<i>Cercaria echinostoma</i> 2	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Brasil	<b>n</b>	Veitenheimer-Mendes (1982)
<i>Cercaria granulifera</i>	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil	<b>*</b>	Veitenheimer-Mendes <i>et al.</i> (1995); Eduardo <i>et al.</i> (2012)
<i>Cercaria guaibensis</i> 3	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil	<b>o</b>	Veitenheimer-Mendes (1981)
<i>Cercaria guaibensis</i> 6	<i>Gundlachia concentrica</i>	Brasil	<b>p</b>	Veitenheimer-Mendes <i>et al.</i> (1995)
<i>Cercaria guaibensis</i> 8	<i>Drepanotrema depressissimum</i>	Brasil	<b>q</b>	Veitenheimer-Mendes <i>et al.</i> (1995)
<i>Cercaria macrogranulosa</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Brasil	<b>r</b>	Ruiz (1952b); Milward-de-Andrade & Campos (1969)
	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil		
	<i>Stenophysa marmorata</i>	Brasil		
	<i>Drepanotrema cimex</i>	Brasil		
<i>Cercaria stylites</i>	<i>Aylacostoma</i> sp.	Brasil	<b>a</b>	Lutz (1933)
<i>Drepanocephalus spathans</i>	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil	<b>b</b>	Lutz (1933); Pinto <i>et al.</i> (2016)
<i>Drepanocephalus mexicanus</i>	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil	<b>c</b>	Pinto <i>et al.</i> (2016)
<i>Echinostoma barbosai</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Brasil	<b>d</b>	Lie & Basch (1966)
	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil		
	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil		
<i>Echinostoma erraticum</i>	<i>Drepanotrema</i> sp.	Brasil	<b>**</b>	Lutz (1924)
<i>Echinostoma exile</i>	<i>Stenophysa marmorata</i>	Brasil	<b>e</b>	Pinto & Melo (2012b)
<i>Echinostoma luisreyi</i>	<i>Physa rivalis</i>	Brasil	<b>f</b>	Maldonado Jr <i>et al.</i> (2003)
<i>Echinostoma nephrocystis</i>	<i>Stenophysa marmorata</i>	Brasil	<b>g</b>	Lutz (1924)

**Fig. 5**

TABELA 5: Continuação...

<i>Echinostoma paraensei</i>	<i>Pseudosuccinea columella</i>	Brasil	<b>h</b>	Lie & Basch (1967); Maldonado Jr <i>et al.</i> (2001)
	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Brasil		
	<i>Stenophysa marmorata</i>	Brasil		
<i>Echinostoma parcespinosum</i>	<i>Pomacea</i> sp.	Brasil	<b>i</b>	Lutz (1924)
<i>Echinostoma revolutum</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Brasil	*	Lutz (1924); Barragán-Saénz <i>et al.</i> (2009)
<i>Echinostoma rodriguesi</i>	<i>Stenophysa marmorata</i>	Brasil	<b>j</b>	Hsu <i>et al.</i> (1968)
Echinostome cercaria	<i>Marisa planogyra</i>	Brasil	<b>k</b>	Mattos <i>et al.</i> (2013)
	<i>Pomacea maculata</i>	Brasil		
	<i>Biomphalaria amazonica</i>	Brasil		
	<i>Biomphalaria occidentalis</i>	Brasil		
	<i>Biomphalaria</i> sp.	Brasil		
	<i>Biomphalaria schrammi</i>	Brasil		
Echinostome cercaria	<i>Stenophysa marmorata</i>	Brasil	**	Cantanhede <i>et al.</i> (2014)
	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil		
	<i>Pomacea maculata</i>	Brasil		
	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Brasil		
Equinocercaria I	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil	*	Eduardo <i>et al.</i> (2012)
	<i>Pseudosuccinea columella</i> ;	Brasil	<b>l</b>	Ueta (1980); Buseti (1983); Müller & Ueno (1984); Carvalho <i>et al.</i> (2001); Gomes <i>et al.</i> (2002); Oliveira <i>et al.</i> (2002)
<i>Fasciola hepatica</i>	<i>Galba viatrix</i>	Brasil		Coelho & Lima (2003); Lima <i>et al.</i> (2009).
	<i>Lymnaea</i> sp.	Brasil		Lutz (1924); Ruiz (1952a;b); Lie & Basch (1967)
<i>Paryphostomum segregatum</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Brasil	<b>m</b>	Milward-de-Andrade (1965a;b); Eduardo <i>et al.</i> (2012)
	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil		
	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil		

TABELA 5: Continuação...

	<i>Biomphalaria</i> sp.	Brasil		
	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Brasil		
<i>Petasiger</i> sp.	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil	<b>n</b>	Milward-de-Andrade & Campos (1969); Pinto <i>et al.</i> (2013a).
	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil		
	<i>Biomphalaria</i> sp.	Brasil		Lutz (1921b; 1922); Rezende <i>et al.</i> (1973); Gonzales <i>et al.</i> (1974)
<i>Philophthalmus gralli</i>	<i>Melanoides tuberculata</i>	Brasil	<b>o</b>	Pinto & Melo (2010b)
<i>Philophthalmus aylacostoma</i>	<i>Melanoides tuberculata</i>	Brasil	<b>p</b>	Pulido-Murillo <i>et al.</i> (2022)
<i>Ribeiroia</i> sp.	<i>Biomphalaria straminea</i>	Brasil	<b>q</b>	Pinto <i>et al.</i> (2013b)
<i>Typhlocoelum cucumerinum</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Brasil	<b>r</b>	Schafranski <i>et al.</i> (1975)
<b>Figura 6.</b>				
Cercaria Echinostomatidae	<i>Physella cubensis</i>	Colômbia	<b>a</b>	Velázquez e Escobar (2001)
Cercaria sp. 1	<i>Melanoides tuberculata</i>	Colômbia	<b>b</b>	Vergara & Velázquez (2009)
Cercaria sp. 2	<i>Melanoides tuberculata</i>	Colômbia	<b>c</b>	Vergara & Velázquez (2009)
Echinocercaria sp. I	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Venezuela	<b>d</b>	Ostrowski de Núñez (1981a)
<i>Guaicaipuria parapseudoconcilia</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>e</b>	Nasir & Silva (1972)
<i>Guaicaipuria pseudoconcilia</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>f</b>	Nasir, Díaz & Guevara (1967)
<i>Cercaria amarillis</i>	<i>Biomphalaria kuhniana</i>	Venezuela	<b>g</b>	Nasir & Díaz (1973b)
<i>Cercaria armikuhniani</i>	<i>Biomphalaria kuhniana</i>	Venezuela	<b>h</b>	Nasir & Díaz (1973b)
<i>Cercaria asaguensis</i>	<i>Marisa cornuarietis</i>	Venezuela	<b>i</b>	Nasir <i>et al.</i> (1969)
<i>Cercaria barceloica</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>j</b>	Nasir (1971)
<i>Cercaria concilia</i>	<i>Marisa cornuarietis</i>	Venezuela	<b>k</b>	Nasir <i>et al.</i> (1967)
<i>Cercaria criollisima</i>	<i>Melongena melongena</i>	Venezuela	<b>l</b>	Nasir & Díaz (1972)
<i>Cercaria kokubdurrie</i>	<i>Biomphalaria kuhniana</i>	Venezuela	<b>m</b>	Nasir & Díaz (1973b)

TABELA 5: Continuação...

<i>Cercaria laurotravassosi</i>	<i>Physa venezuelensis</i>	Venezuela	<b>n</b>	Nasir & Díaz (1973b)
<i>Cercaria macarapanensis</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>o</b>	Nasir & Acuña (1965)
<i>Cercaria paraudoii</i>	<i>Marisa cornuarietis</i>	Venezuela	<b>p</b>	Nasir <i>et al.</i> (1969)
<i>Cercaria penalveri</i>	<i>Pseudosuccinea columella</i>	Venezuela	<b>q</b>	Nasir (1964)
<i>Cercaria plieguicauda</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>r</b>	Nasir & Díaz (1973a)
<b>Fig. 7</b>				
<i>Cercaria pomacea</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>a</b>	Nasir & Díaz (1968)
<i>Cercaria pyrgophspiralis</i>	<i>Biomphalaria kuhniana</i>	Venezuela	<b>b</b>	Nasir & Díaz (1973b)
<i>Cercaria sanlorenzensis</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>c</b>	Nasir & Acuña (1964)
<i>Cercaria santacruziana</i>	<i>Marisa cornuarietis</i>	Venezuela	<b>d</b>	Nasir (1973)
<i>Cercaria stenophysae</i>	<i>Marisa cornuarietis</i>	Venezuela	<b>e</b>	Nasir & Acuña (1965)
<i>Cercaria sucrensis</i>	<i>Physa venezuelensis</i>	Venezuela	<b>f</b>	Nasir & Díaz (1973b)
<i>Cercaria udoi</i>	<i>Marisa cornuarietis</i>	Venezuela	<b>g</b>	Nasir <i>et al.</i> (1969)
<i>Echinochasmus zubeckhaname</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>h</b>	Nasir & Díaz (1967)
<i>Echinostoma donosoi</i>	<i>Marisa cornuarietis</i>	Venezuela	<b>i</b>	Nasir (1964)
<i>Petasiger novendecim</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Venezuela	<b>j</b>	Nasir <i>et al.</i> (1972)
<i>Petasiger sp.</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Venezuela	<b>k</b>	Ostrowski de Núñez (1981a)
<i>Philophthalmus gralli</i>	<i>Melanoides tuberculata</i>	Venezuela	<b>l</b>	Díaz <i>et al.</i> (2002)
<i>Ribeiroia sp.</i>	<i>Biomphalaria prona</i>	Venezuela	<b>m</b>	Ostrowski de Núñez (1981a)
<i>Stephanoprora denticulata</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Venezuela	<b>n</b>	Nasir & Scorza (1968)
<i>Stephanoprora paradenticulata</i>	<i>Marisa cornuarietis</i> ; <i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>o</b>	Nasir & Rodríguez (1969)
Cercaria Echinostomatidae Nº 1	<i>B. straminea</i> ; <i>B. tenagophila</i>	Uruguai	***	Martorelli <i>et al.</i> (2013)
Cercaria Echinostomatidae Nº 2	<i>B. tenagophila</i>	Uruguai	***	Martorelli <i>et al.</i> (2013)
Cercaria Echinostomatidae Nº 4	<i>B. tenagophila</i> ; <i>B. straminea</i>	Uruguai	***	Martorelli <i>et al.</i> (2013)

\*Figura de má qualidade. \*\*Figura não disponível. \*\*\* Relatadas na Argentina na Figura 2

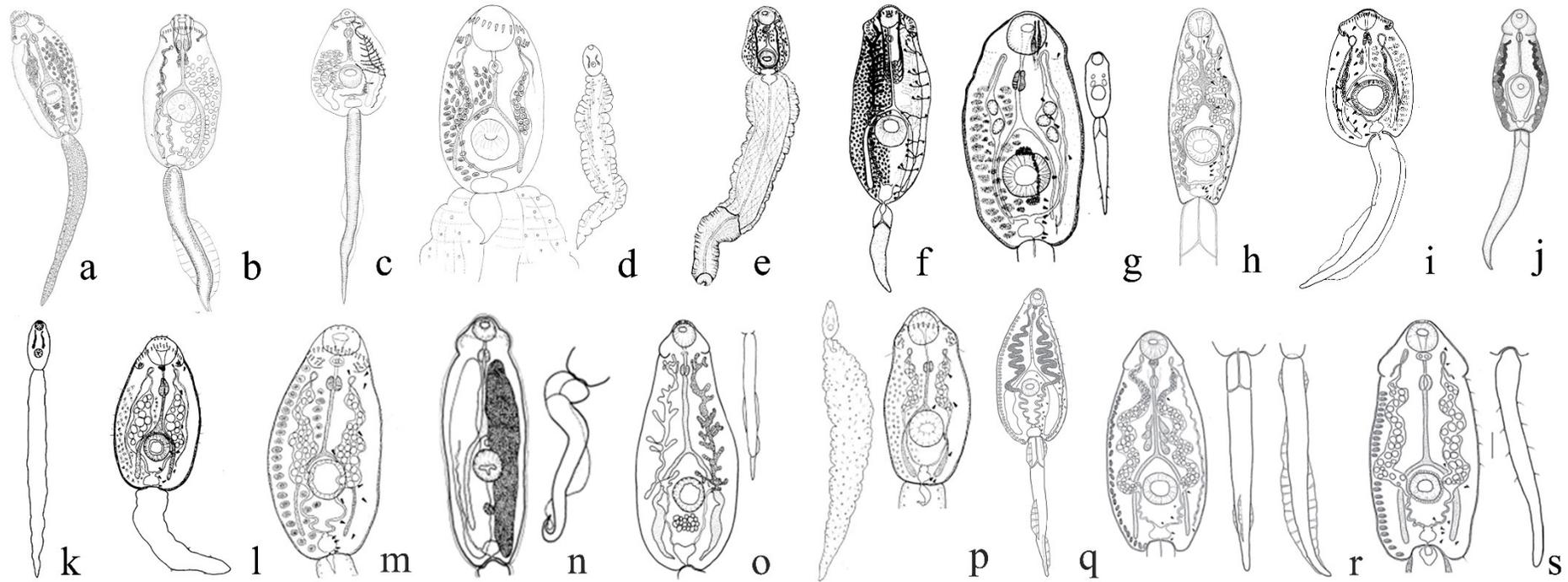


FIGURA 3- Cercárias do tipo equinóstoma e gimnocéfala encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul. **a.** Cercaria Echinostomatidae N° 1; **b.** Cercaria Echinostomatidae N° 2; **c.** Echinostomatidae N° 3; **d.** Echinostomatidae N° 4; **e.** *Cercaria heleobicola* IV; **f.** *Cercaria heleobicola* V; **g.** *Cercaria macrogranulosa*, **h.** *Ribeiroia* sp. **i.** Echinocercaria sp.; **j.** Echinocercaria gen. sp. 1; **k.** Echinocercaria sp. I; **l.** Echinocercaria sp. II; **m.** Echinocercaria sp. III; **n.** Echinocercaria sp. IV; **o.** Echinocercaria sp. V; **p.** Echinocercaria sp. VII; **q.** Echinocercaria sp. XIII; **r.** Echinocercaria sp. XIV; **s.** Echinocercaria sp. XVI. Para informações de cada uma das larvas consultar Tabela 5.

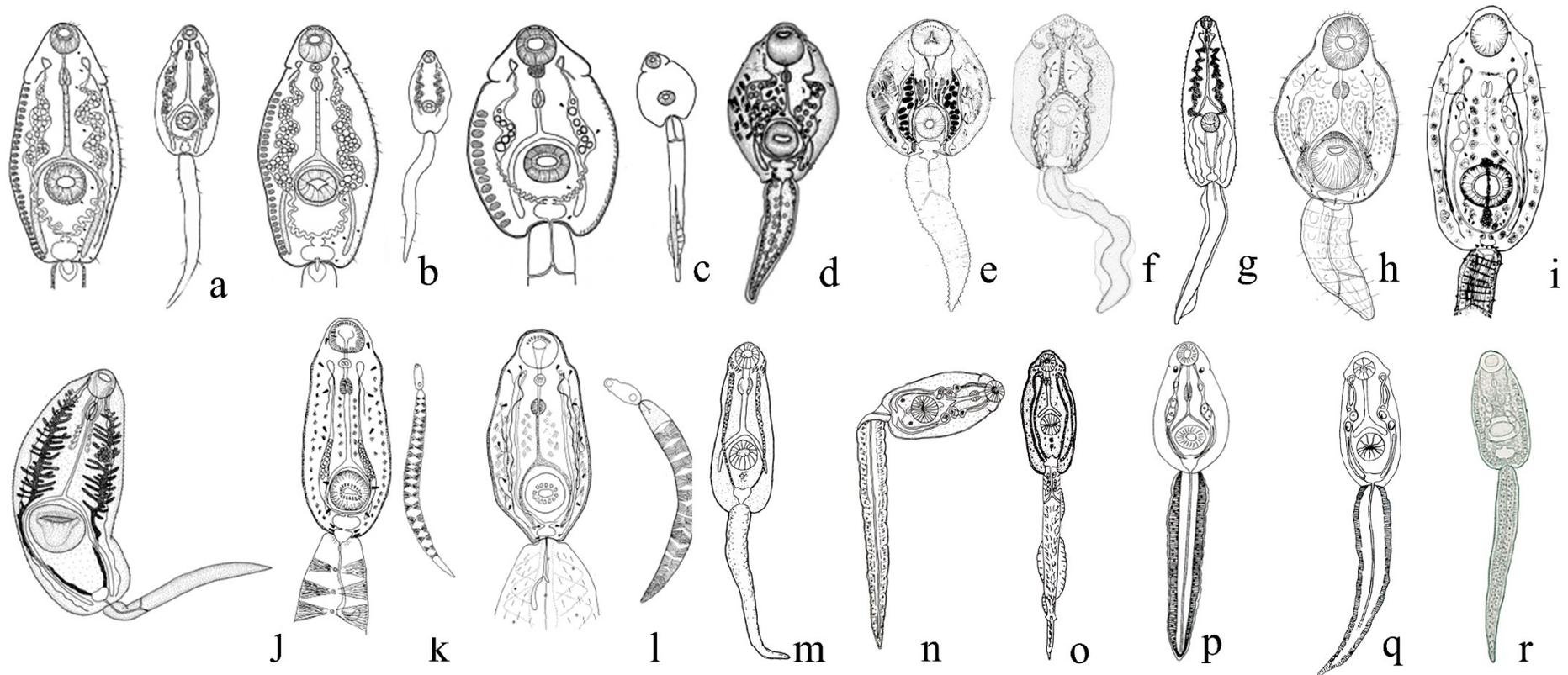


FIGURA 4- Cercárias do tipo equinóstoma e gimnocéfala encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul. **a.** *Echinocercaria* sp.1; **b.** *Echinocercaria* sp. 2; **c.** *Echinocercaria* sp. 3; **d.** *Echinochasmus* sp.; **e.** *Echinochasmus talaensis*; **f.** *Echinochasmus parcespinosum*; **g.** *Episthmium suspensum*; **h.** *Gimnocephala* sp. I; **i.** *Gimnocephala* sp. II; **j.** *Himasthla* sp.; **k.** *Stephanoprora aylacostoma*; **l.** *Stephanoprora uruguayensis*; **m.** *Cercaria echinostoma* 1; **n.** *Cercaria echinostoma* 2; **o.** *Cercaria guaibensis* 3; **p.** *Cercaria guaibensis* 6; **q.** *Cercaria guaibensis* 8; **r.** *Cercaria macrogranulosa*. Para informações de cada uma das larvas consultar Tabela 5.

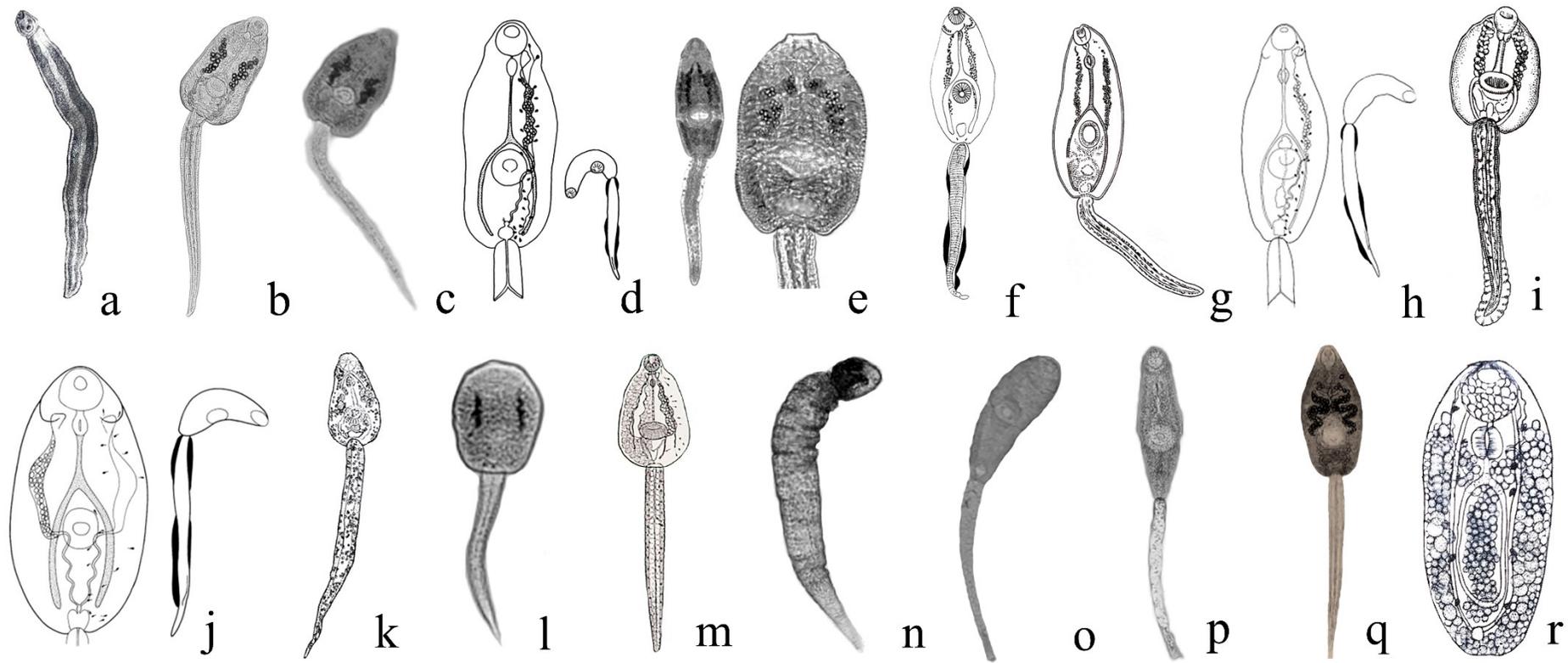


FIGURA 5- Cercárias do tipo equinóstoma e gimnocéfala encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul. **a.** *Cercaria stylites*; **b.** *Drepanocephalus spathans*; **c.** *Drepanocephalus mexicanus*; **d.** *Echinostoma barbosai*; **e.** *Echinostoma exile*; **f.** *Echinostoma luisreyi*; **g.** *Echinostoma nephrocystis*; **h.** *Echinostoma paraensei*; **i.** *Echinostoma parcespinosum*; **j.** *Echinostoma rodriguesi*; **k.** *Echinostome cercaria*; **l.** *Fasciola hepatica*; **m.** *Paryphostomum segregatum*; **n.** *Petasiger* sp.; **o.** *Philophthalmus gralli*; **p.** *Philophthalmus aylacostoma*; **q.** *Ribeiroia* sp.; **r.** *Typhlocoelum cucumerinum*. Para informações de cada uma das larvas consultar Tabela 5.

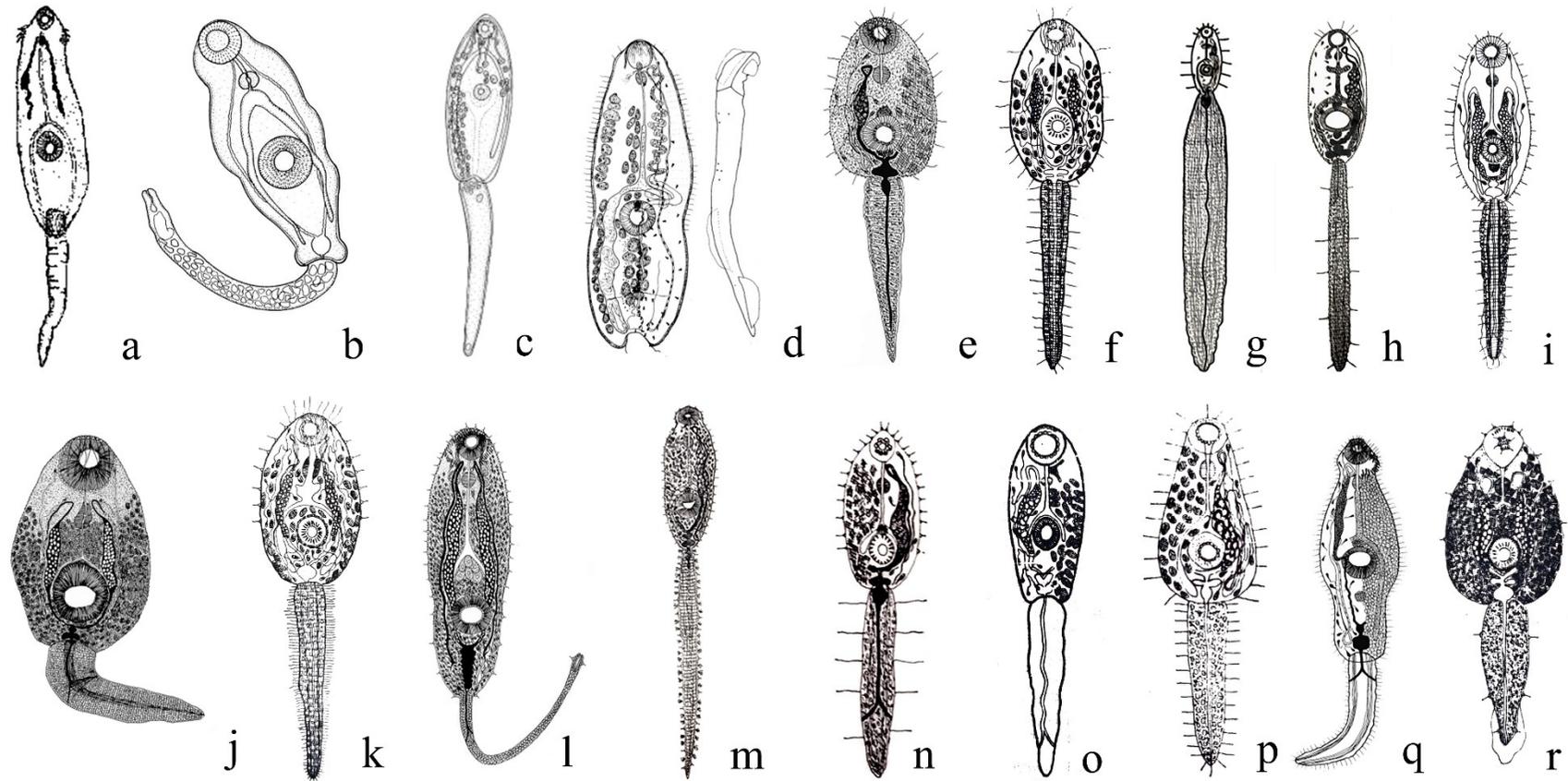


FIGURA 6- Cercárias do tipo equinóstoma e gimnocéfala encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul. **a.** Cercaria Echinostomatidae; **b.** Cercaria sp. 1; **c.** Cercaria sp. 2; **d.** Echinocercaria sp. I; **e.** *Guaicaipuria parapseudoconcilia*; **f.** *Guaicaipuria pseudoconcilia*; **g.** *Cercaria amarillis*; **h.** *Cercaria armikuhniani*; **i.** *Cercaria asaguensis*; **j.** *Cercaria barceloica*; **k.** *Cercaria concilia*; **l.** *Cercaria criollissima*; **m.** *Cercaria kokubdurrie*; **n.** *Cercaria laurotravassosi*; **o.** *Cercaria macarapanensis*; **p.** *Cercaria paraudo*; **q.** *Cercaria penalveri*; **r.** *Cercaria pliegicauda*. Para informações de cada uma das larvas consultar Tabela 5.

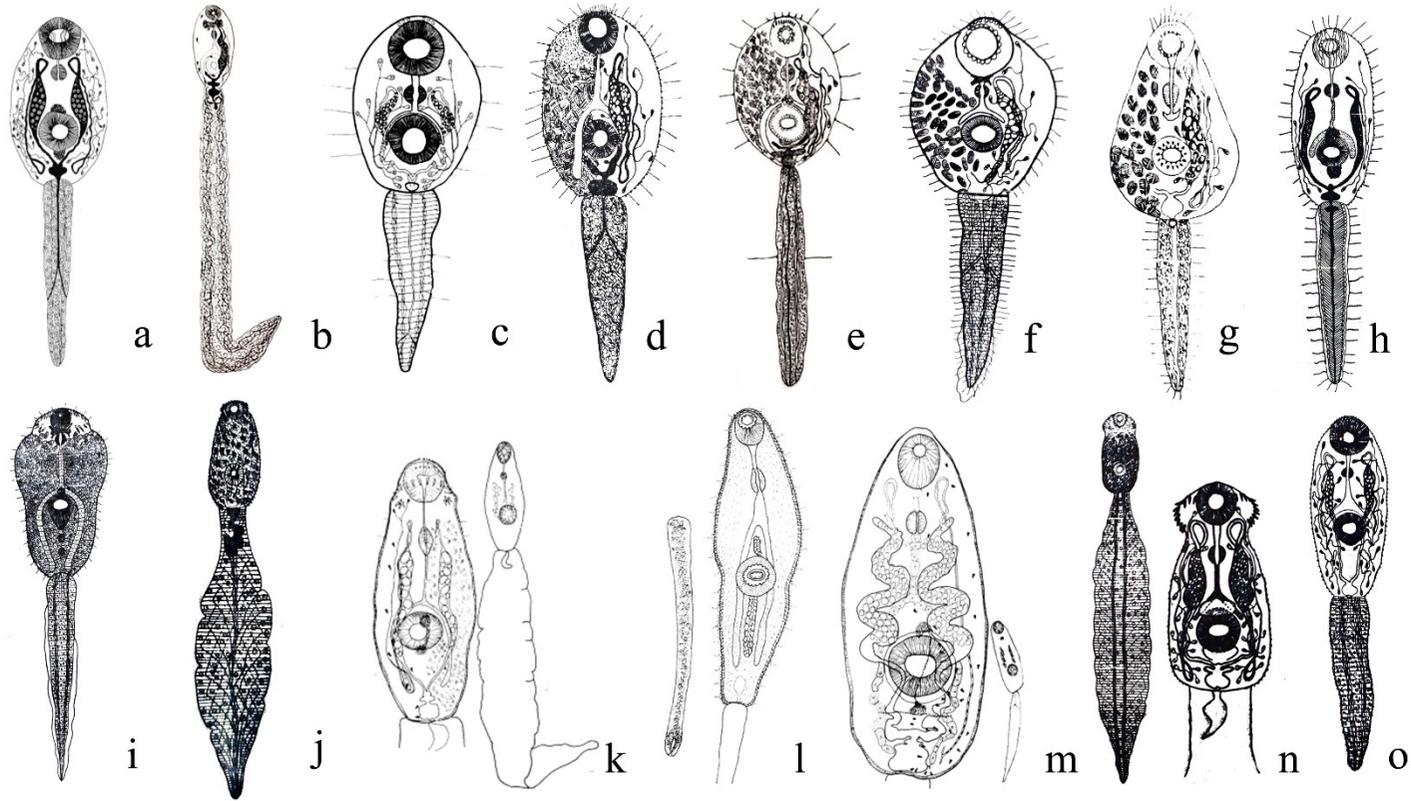


FIGURA 7- Cercárias do tipo equinóstoma e gimnocéfala encontradas em moluscos dulceaquícolos na América do Sul. **a.** *Cercaria pomacea*; **b.** *Cercaria pyrgophspiralis*; **c.** *Cercaria sanlorenzensis*; **d.** *Cercaria santacruzia*; **e.** *Cercaria stenophysae*; **f.** *Cercaria sucrensis*; **g.** *Cercaria udoi*; **h.** *Echinochasmus zubedakhaname*; **i.** *Echinostoma donosoi*; **j.** *Petasiger novendecim*; **k.** *Petasiger* sp.; **l.** *Philophthalmus gralli*; **m.** *Ribeiroia* sp.; **n.** *Stephanoprora denticulata*; **o.** *Stephanoprora paradenticulata*. Para informações de cada uma das larvas consultar Tabela 5.

### 5.1.2- Resultados

Dez cercárias dos tipos equinóstoma e gimnocéfala foram identificadas como pertencentes à superfamília Echinostomatoidea. Estas larvas, foram encontradas em moluscos ampularídeos do gênero *Pomacea* e planorbídeos dos gêneros *Biomphalaria*, *Gundlachia* e *Drepanotrema*. Considerando-se as novas coletas realizadas, dos 1706 exemplares de moluscos coletados, 89 (5,2%) estavam infectados com larvas do tipo equinóstoma. Do total de amostras (previamente coletadas e novas coletas), as larvas foram associadas a 12 espécies de trematódeos, a maior parte (11 espécies) pertencentes à família Echinostomatidae e uma espécie à Echinochasmidae. Os resultados obtidos são apresentados a seguir, juntamente com comentários taxonômicos.

#### 5.1.2.1- Echinochasmidae gen. sp. (Echinostomatoidea: Echinochasmidae)

Localidade: Palmeirândia e São Vicente Ferrer, Maranhão, Brasil.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Pomacea maculata*

##### 5.1.2.1.1- Caracterização morfológica

Corpo espinhoso e ovalado (Figura 8). Cauda sem membrana natatória, sem espinhos, nem flagelos. Ventosas com diâmetro similar. Ventosa ventral pós equatorial. Pré-faringe curta. Faringe muscular. Esôfago e cecos intestinais ausentes. Glândulas cistogênicas com conteúdo rabditiforme. Concreções nos canais exteriores localizadas uma a cada lado da ventosa ventral alcançando apenas a metade anterior desta. Rédias de cor castanho foram recuperadas da glândula digestiva, com faringe muscular subterminal, ceco intestinal longo e apêndices locomotores localizados na região posterior do corpo. As medidas das cercárias obtidas de *Pomacea* spp. e de outras larvas similares relatadas por diferentes autores na Argentina e Venezuela são apresentadas na Tabela 6.

##### 5.1.2.1.2- Estudo molecular

O conjunto de dados 28S (Figura 9) consistiu em 31 sequências que após terem as extremidades cortadas gerou um alinhamento de 1160 pb. Foram utilizadas para comparação sequências nucleotídicas de espécies dos gêneros *Echinochasmus*,

*Stephanoprora* e *Microparyphium*, por serem os gêneros da família Echinochasmidae com dados disponíveis na base de dados. Além disso, algumas espécies da família Echinostomatidae também foram incluídas nas análises, assim como três isolados identificados como Echinochasmidae sp., que também foram obtidos de um molusco ampularídeo, *Asolene platae*, na Argentina.

A análise filogenética revelou o agrupamento destas larvas em um clado bem suportado contendo representantes da família Echinochasmidae, mas sem se agrupar com nenhum dos gêneros desta família incluído nas análises. As árvores filogenéticas mostraram que as larvas obtidas de *P. maculata* agruparam no mesmo clado que os três isolados identificados como Echinochasmidae sp. da Argentina, com divergência nucleotídica de 1-2,8%. Considerando-se os outros membros da família, a divergência molecular variou de 4-6,2%. Diferenças maiores foram verificadas em relação às espécies de Echinostomatidae (8-11,8%) (Anexo 2: Tabela 1).

A sequência obtida para ITS1-5.8S-ITS2 (Figura 10) possuía 1007 pb, sendo que a mesma sequência foi usada para a construção de dois alinhamentos: um para a região parcial ITS1 (Figura 9a), para efeitos de comparação com os isolados obtidos na Argentina, que possuem similaridade com as amostras deste estudo e continha outras 18 sequências, com um tamanho final de 498 pb. O outro alinhamento, contempla a região ITS2 (Figura 9b) com um tamanho final de 528 pb, construído com a finalidade de comparar com sequências como *E. coaxatus*, *E. japonicus*, dentre outras. Foram incluídos nas análises isolados de espécies dos mesmos gêneros incluídos na análise 28S (*Stephanoprora*, *Echinochasmus*, *Rhopalias* e os três isolados de Echinochasmidae sp. da Argentina). Adicionalmente foram usadas outras sequências de alguns Echinostomatidae como *Petasiger*, *Paryphostomum*, *Ribeiroia*, *Rhopalias*, *Paryphostomum*, *Isthmiophora* e *Drepanocephalus* para comparação. No geral, o resultado obtido foi similar ao verificado nas análises de 28S, sendo evidenciado o agrupamento da espécie em estudo no clado da família Echinochasmidae e em um subclado contendo isolados de cercárias obtidas de *A. platae* da Argentina (ITS1), apresentando uma divergência de 2,5-5,1%. Para ITS2 evidenciamos o agrupamento do isolado de Echinochasmidae gen. sp. num clado próximo das sequências de *E. coaxatus* (espécie tipo) e *E. japonicus* com divergências de 8,1% e 8,7%, respectivamente. Considerando-se outras espécies desta família incluídas nas análises, a divergência foi de 11,6-13% (ITS1) e 13,5-15,8% (ITS2), menores do que a verificada em relação às espécies de Echinostomatidae (19,2-21,9% ITS1 e 14,1-23,9 ITS2) (Anexo 2: Tabelas 2 e 3). As análises filogenéticas realizadas

neste estudo revelaram que a cercária encontrada em *Pomacea* spp. e aqui caracterizada é um membro da família Echinochasmidae.

#### 5.1.2.1.3- Comentários taxonômicos

A comparação entre as larvas aqui identificadas como Echinochasmidae gen. sp. e outras larvas semelhantes verificadas em ampulariídeos na América do Sul, revelou similaridades morfológicas com uma larva do tipo gimnocéfala encontrada em *Pomacea glauca* na Venezuela e descrita como *Guaicaipuria parapseudoconsilia* Nasir & Silva, 1972, a partir de estágios evolutivos obtidos experimentalmente. As cercárias de *G. parapseudoconsilia* apresentam como característica morfológica diferencial a ausência de esôfago e cecos intestinais. Além disso, os resultados moleculares obtidos sugerem que o isolado do presente estudo pertence ao mesmo gênero, mas a espécies distintas, de isolados reportados em *Asolene platae* na Argentina (DELLAGNOLA *et al.*, 2019). O avanço na identificação específica demanda a obtenção de sequências obtidas de parasitos adultos recuperados de hospedeiros experimentais ou naturais, sendo estes últimos ainda desconhecidos.

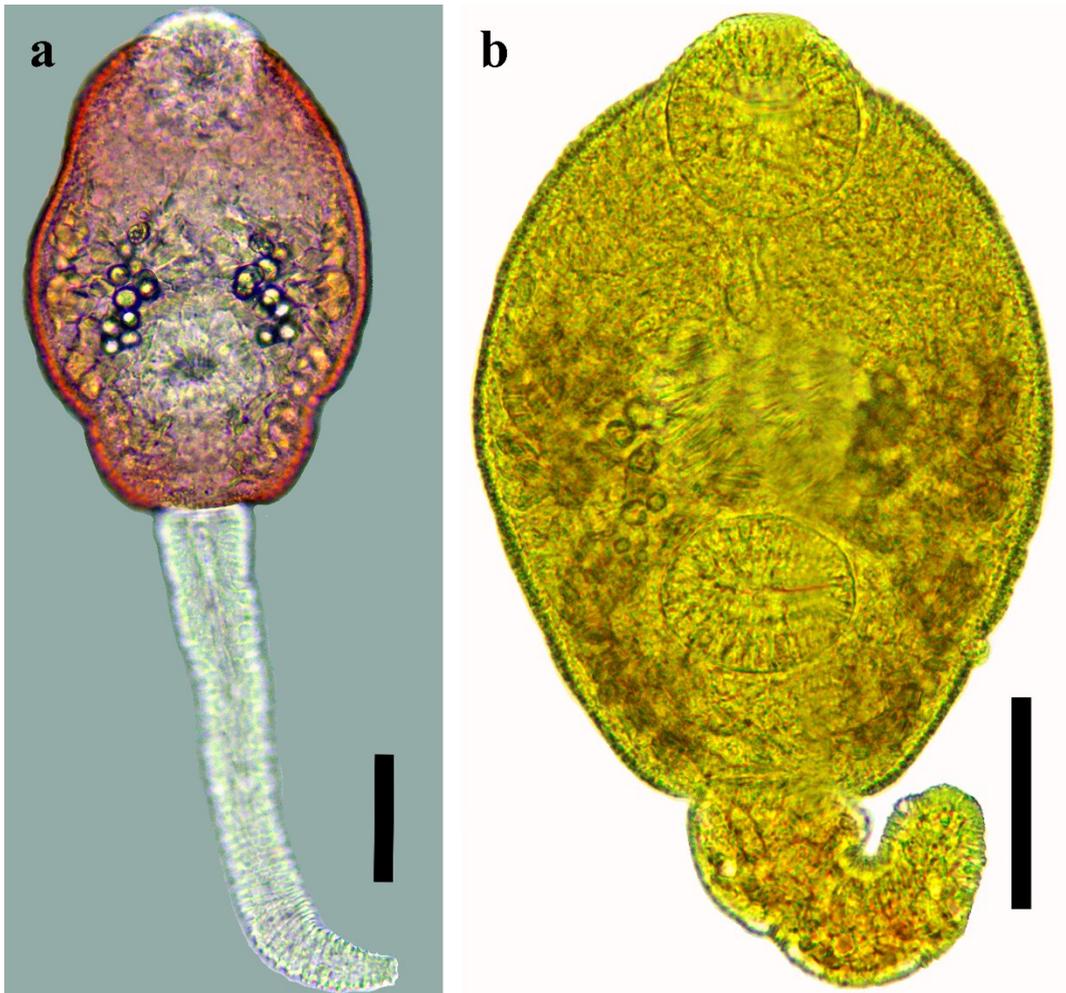


FIGURA 8- Echinochasmidae gen. sp.: (a) Cercária emergida de *P. maculata* naturalmente infectada corada por vermelho neutro (b) Cercária corada pelo Lugol. Escalas: 50  $\mu\text{m}$  (a, b).

TABELA 6- Dados morfométricos das cercárias de Echinochasmidae gen. sp., encontradas em *Pomacea* spp. em Palmeirândia e São Vicente Ferrer, MA e os dados de cercárias similares encontradas na Venezuela

<b>Espécie</b>	<b>Echinochasmidae gen. sp.</b>	<i>Guaicaipuria parapseudoconcilia</i>	<i>Guaicaipuria pseudoconcilia</i>	<i>Echinochasmus zubedakhaname</i>	<i>Cercaria barceloica</i>	<i>Cercaria Pomacea</i>	<i>Cercaria sanlorenzensis</i>	
<b>Localidade</b>	Brasil	Venezuela	Venezuela	Venezuela	Venezuela	Venezuela	Venezuela	
<b>Hospedeiro</b>	<i>Pomacea maculata</i>	<i>Pomacea glauca</i>	<i>P. glauca</i>	<i>P. glauca</i>	<i>P. glauca</i>	<i>P. glauca</i>	<i>P. glauca</i>	
<b>Referência</b>	Presente estudo	NASIR & SILVA (1972)	NASIR <i>et al.</i> (1967)	NASIR & DÍAZ (1967)	NASIR (1971)	NASIR & DÍAZ (1968)	NASIR (1964)	
<b>Corpo</b>	C	161 ± 13 (140-185)	166-199	165-231	120-132	210-266	175-240	150-216
	L	94 ± 7 (82-111)	92-122	96-129	37-62	140-238	105-165	105-144
<b>Cauda</b>	C	168 ± 4 (161-176)	203-238	192-234	135-150	168-252	200-273	171-234
	L	34 ± 2 (31-38)	40-48	33-42	22-27	56-140	32-45	42-57
<b>Ventosa oral</b>	C	41 ± 2 (38-43)	40-48	45-58	22-27	56-88	42-47	45-57
	L	37 ± 2 (34-41)						
<b>Ventosa ventral</b>	C	37 ± 2 (34-43)	40-48	42-48	17-25	56-92	40-52	-
	L	36 ± 2 (33-43)	-	-	-	-	-	-
<b>Faringe</b>	C	14 ± 2 (10-17)	14-22	15-19	10-12	20-32	17-25	15-27
	L	11 ± 1 (10-14)	-	-	-	15-25	-	-

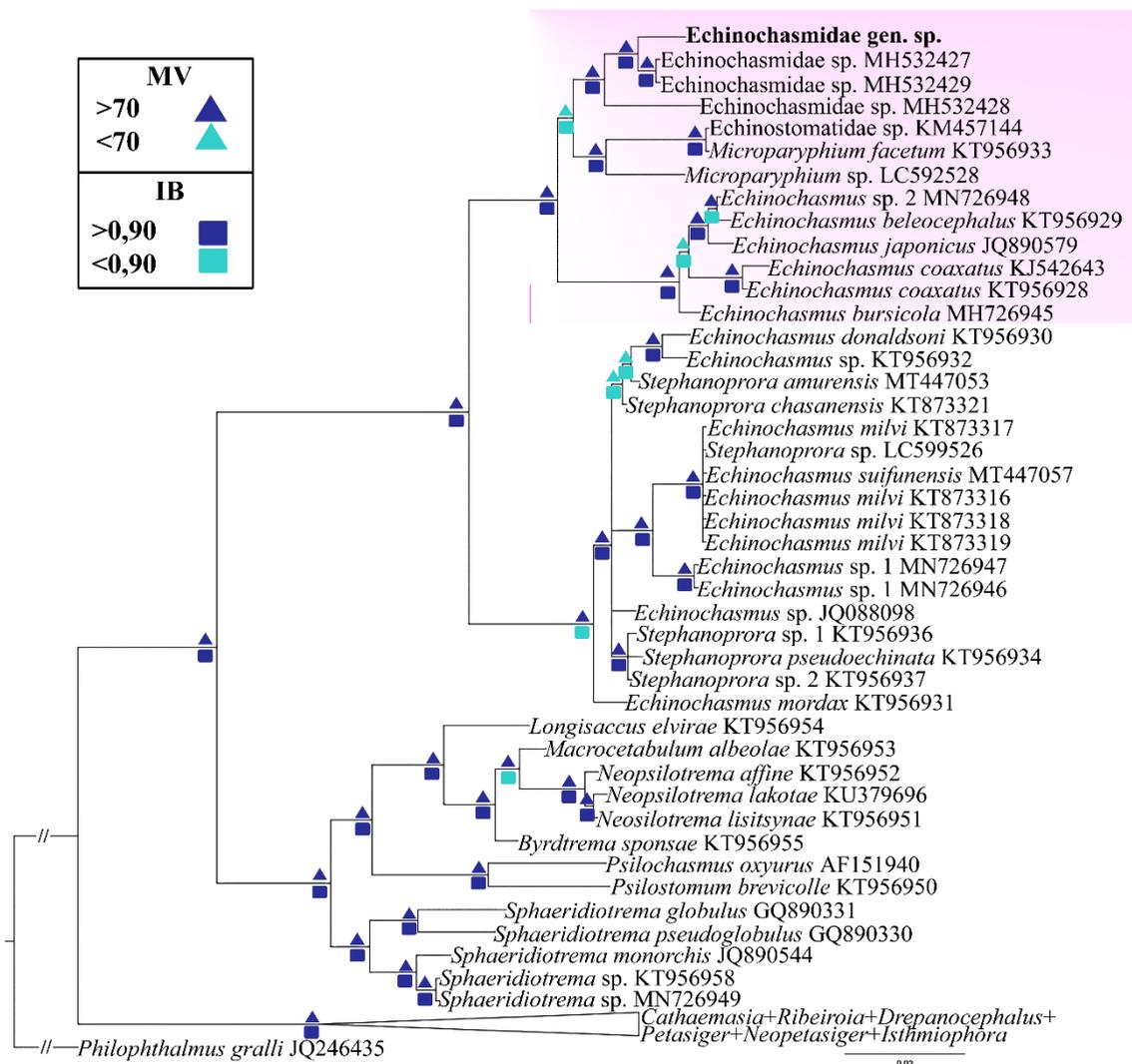


FIGURA 9- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene 28S de cercárias identificadas como *Echinochasmidae* gen. sp. encontradas em *Pomacea maculata* no Brasil (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo GTR+G+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Philophthalmus gralli* foi usado como grupo externo.

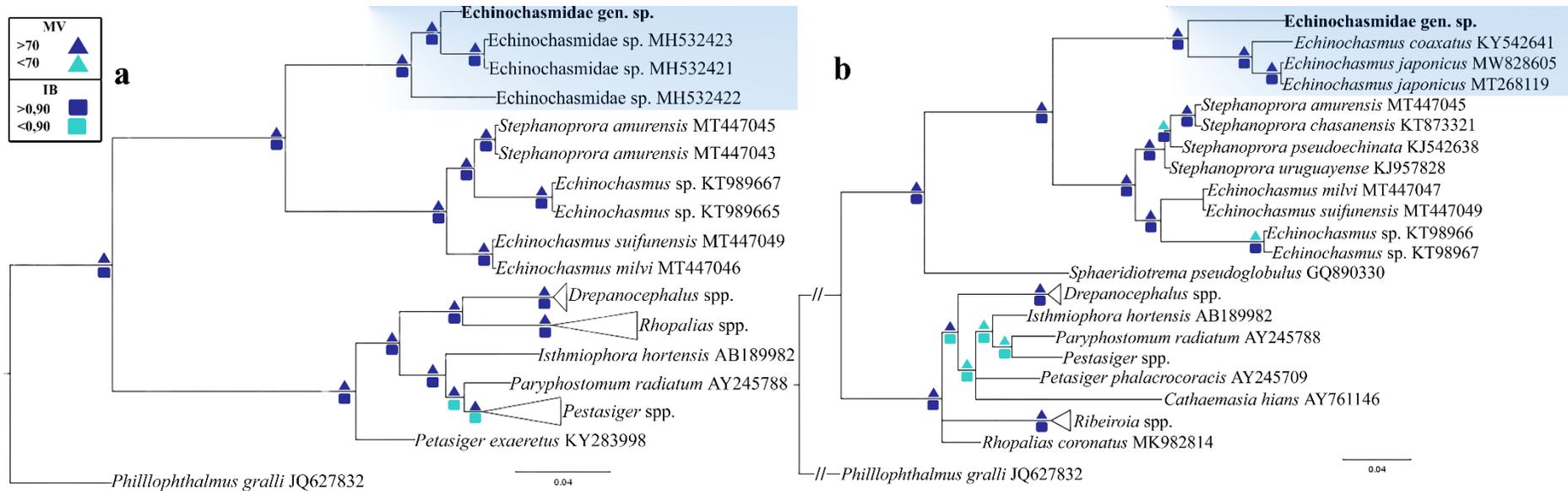


FIGURA 10- Relação filogenética baseada na análise de seqüências parciais da região transcrita espaçadora interna ITS1 (a) e ITS2 (b) de cercárias identificadas como *Echinochasmidae* gen. sp. encontradas em *Pomacea maculata* no Brasil (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com seqüências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo K2+G (a, b). O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior ( $\square$ ) e bootstrap ( $\Delta$ ), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Phillophthalmus gralli* foi usado como grupo externo.

#### 5.1.2.2- *Drepanocephalus spathans* Dietz, 1909 (Echinostomatoidea: Echinostomatidae)

Localidade: Belo Horizonte, Betim e Contagem, Minas Gerais, Brasil

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria occidentalis*

##### 5.1.2.2.1- Caracterização morfológica

A amostra desta larva (Figura 11) foi usada exclusivamente para análises moleculares uma vez que a avaliação morfológica foi previamente realizada por PINTO *et al.* (2016).

##### 5.1.2.2.2- Estudo molecular

O conjunto de dados 28S (Figura 14) consistiu em duas sequências das localidades de Belo Horizonte (1070 pb) e Contagem (1204 pb), e foram utilizadas as sequências de cercárias do presente estudo e as disponíveis no GenBank, de 27 e 19 espinhos no colar cefálico para comparação, sendo estas pertencentes a parasitos dos gêneros *Drepanocephalus*, *Neopetasisger*, *Petasisger* e *Cercaria granulífera* e formaram um alinhamento final de 1152 pb. A análise mostrou que as larvas do presente estudo agruparam no clado de *Drepanocephalus* e que diferenças nucleotídicas entre os isolados do México, EUA e Brasil foram de 0,09%. No caso das análises realizadas com o marcador mitocondrial *Nad-1* (Figura 15), foi possível observar que as cercárias das duas localidades aqui estudadas são coespecíficas com *Drepanocephalus spathans*, sendo verificada uma divergência molecular de 0,2-4,9%. Além disso, verificou-se diferenças significativas (12,5-15,9%) em relação a outras espécies com dados disponíveis para comparação *Drepanocephalus mexicanus* Lamothe-Argumedo & Perez Ponce de Leon, 1989 (Anexo 2: Tabelas 4 e 5).

##### 5.1.2.2.3- Comentários taxonômicos

Desde o ponto de vista morfológico, as larvas aqui relatadas de três localidades do estado de Minas Gerais, encontradas em *Biomphalaria straminea*, apresentaram similaridade morfológica com *D. spathans* relatado por PINTO *et al.* (2016) em uma das localidades do presente estudo e no mesmo hospedeiro. O gênero *Drepanocephalus* foi

descrito pela primeira vez no comoram do neotrópico *Nannopterum brasilianus* no Brasil (DIETZ, 1909). Desde então, a espécie *D. spathans* foi relatada de *N. brasilianus* em vários países da América do Sul, incluindo Brasil (TRAVASSOS *et al.*, 1969; MONTEIRO *et al.*, 2011), Argentina (OSTROWSKI DE NÚÑEZ 1968; LUNASCHI *et al.*, 2007; DRAGO *et al.*, 2011), Colômbia (RIETSCHEL & WERDING 1978), Paraguai (KOSTADINOVA *et al.*, 2002) e Venezuela (LUTZ, 1928). Apesar dos registros anteriores desta espécie no país, os resultados obtidos no presente estudo correspondem ao primeiro registro da participação de *B. occidentalis* como primeiro hospedeiro intermediário de *D. spathans*.

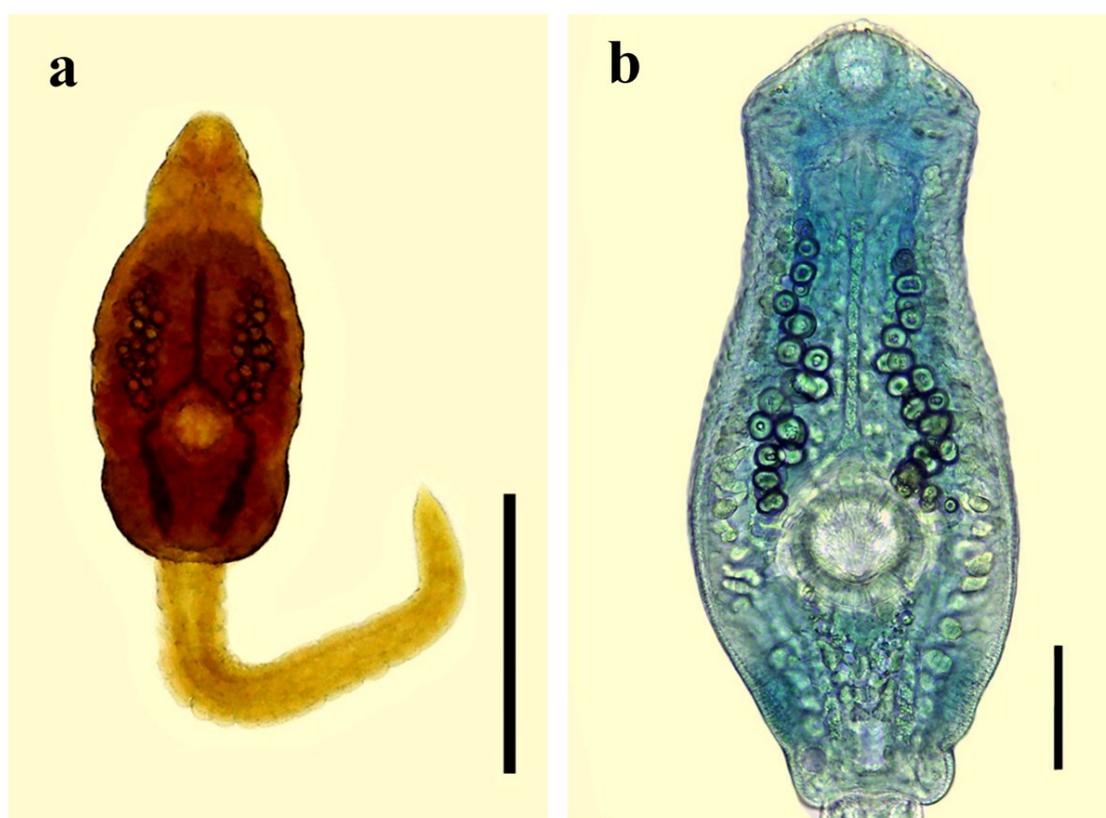


FIGURA 11- *Drepanocephalus spathans*: (a) Cercária emergida de *Biomphalaria occidentalis* naturalmente infectada em Betim, Minas Gerais, Brasil (b) Detalhe do corpo. Escalas: 200  $\mu$ m (a), 50  $\mu$ m (b).

### 5.1.2.3- *Neopetasiger* sp. (Echinostomatoidea: Echinostomatidae)

Localidade: Belo Horizonte, Betim e Contagem - Minas Gerais, Brasil.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria occidentalis* e *Biomphalaria straminea*.

#### 5.1.2.3.1- Caracterização morfológica

Corpo pequeno, ovalado (Figura 11). Ventosa oral subterminal, arredondada. Prefaringe presente. Faringe presente, muscular com pigmentação escura (marrão). Colar cefálico com 19 espinhos. Esôfago longo. Ventosa ventral localizada na região anterior da porção posterior do corpo, de tamanho similar à ventosa oral. Tubos excretores principais com aproximadamente vinte concreções circulares, bem diferenciadas que vão desde a ventosa ventral até a faringe. Células cistogênicas com conteúdo em forma de barra distribuídas desde a região posterior até a faringe. Cauda longa, de comprimento e largura muito maior que o corpo. A movimentação da cercária viva é em forma de ‘S’. Rédias alongadas de coloração amarela-laranja, com um par de apêndices locomotores na região posterior. Faringe pequena e esôfago que se estende até a região equatorial (cor marrom escura). As medidas das cercárias de *Neopetasiger* sp. do presente estudo são apresentadas na tabela 7.

#### 5.1.2.3.2- Estudo molecular

Foram geradas sequências de 1221 pb (Betim) e 1155 pb (Contagem) do gene 28S. As mesmas foram comparadas com sequências de espécies da família com colar cefálico de 27 e 19 espinhos. O alinhamento final foi de 1152 pb. As análises filogenéticas evidenciaram que os isolados de *Neopetasiger* do presente estudo formaram um clado bem suportado com *Neopetasiger* sp. dos Estados Unidos (TKACH *et al.*, 2016) e *Petasiger* sp. 4 do Canadá (SELBACH *et al.*, 2014) (Figura 14), com uma divergência de 0,09% em relação a ambos isolados norte-americanos. Na análise com o marcador mitocondrial *Nad-1* (Figura 15), foi possível obter sequências para os isolados de três localidades: 456 pb (Contagem), 479 pb (Betim) e 489 (Belo Horizonte), as quais foram comparadas com outros membros da família (alinhamento final de 410 pb). Novamente, os isolados de *Neopetasiger* sp. avaliados no presente estudo agruparam-se em um clado

bem suportado com *Neopetasiger* sp. 4, *Petasiger* sp. e *Petasiger* sp. 4 do Canadá, com 4-4,6% de diferença. Considerando-se as demais espécies usadas para comparação, as diferenças foram de 19,8-29% (Anexo 2: Tabelas 4 e 5). Tendo em conta que as divergências com o marcador mitocondrial *Nad-1* foram relativamente altas e não estava claro se os isolados de *Neopetasiger* sp. pertenciam à mesma espécie que os isolados do Canadá, foi feita a análise de delimitação de espécies, ASAP (PUILLANDRE *et al.*, 2019). Como resultado, foi escolhida a partição com o menor score. Essa partição estava constituída por 15 grupos que em teoria correspondem a 15 espécies encontradas no alinhamento, sendo que o grupo 1 está formado pelos isolados do presente estudo, das localidades de Betim, Contagem e Belo Horizonte, *Neopetasiger* sp. 4 (MH369313), *Petasiger* sp. (KT831343), *Petasiger* sp. 4 (MH369617) e *Petasiger* sp. 4 (KM191817). Assim, é possível inferir que a espécie de *Neopetasiger* encontrada no Brasil, no presente estudo é coespecífica com as espécies que ocorrem no Canadá.

#### 5.1.2.3.3- Comentários taxonômicos

As cercárias foram identificadas como *Neopetasiger* sp. e apresentaram características gerais semelhantes a *Petasiger* sp. 2 relatada por PINTO *et al.* (2013a). *Petasiger* sp. 1 e *Petasiger novendecim* de NASIR *et al.* (1972), porém, com cauda menor. Características específicas do gênero, como a presença de cauda longa, 19 espinhos no colar cefálico, a presença de coloração amarelo-acastanhada no interior da faringe e movimento em forma de S, foram verificadas nas larvas analisadas no presente estudo. O gênero *Neopetasiger* Bashkirova, 1941, possui como espécie tipo a *Neopetasiger skrjabini*. No Brasil, os registros prévios da ocorrência destes parasitos foram realizados antes da revisão de TKACH *et al.* (2016) e por isso tratados a época como *Petasiger*. Nesse sentido, na América do Sul, as seguintes espécies foram relatadas em aves ou moluscos: *Neopetasiger argentinesis* (LUNASCHI & DRAGO, 2010), *Neopetasiger novendecim* (NASIR *et al.*, 1972) e *Neopetasiger* spp. (revisado por PINTO & MELO 2013b).



FIGURA 12-. *Neopetasiger* sp. (a) Cercária emergida de exemplares de *Biomphalaria occidentalis* encontradas em Contagem, Minas Gerais. Escala: 200  $\mu$ m.

TABELA 7- Dados morfométricos das cercárias de *Neopetasiger* sp., encontradas em *B. straminea*. em Belo Horizonte, Betim e Contagem, Minas Gerais e os dados de cercárias similares

<b>Espécie</b>		<i>Neopetasiger</i> sp.	<i>Neopetasiger</i> sp. 1	<i>Neopetasiger</i> sp. 2	<i>Neopetasiger novendecim</i>
<b>Localidade</b>		Brasil	Brasil	Brasil	Venezuela
<b>Hospedeiro</b>		<i>B. straminea</i>	<i>B. straminea</i> , <i>B. tenagophila</i>	<i>B. straminea</i> , <i>B. tenagophila</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>
<b>Referência</b>		Presente estudo	PINTO <i>et al.</i> (2013a)	PINTO <i>et al.</i> (2013a)	NASIR <i>et al.</i> (1972)
<b>Corpo</b>	C	146 ± 9 (123-163)	197 ± 12 (177-218)	175 ± 13 (137-205)	140-180
	L	47 ± 11 (36-73)	75 ± 7 (67-94)	68 ± 5 (55-75)	60-79
<b>Cauda</b>	C	993 ± 114 (787-1134)	486 ± 45 (410-594)	883 ± 94 (774-1152)	394-451
	L	138 ± 12 (106-156)	94 ± 11 (75-115)	135 ± 18 (102-184)	47-117
<b>Ventosa oral</b>	C	23 ± 3 (20-27)	32 ± 2 (27-34)	30 ± 1 (27-33)	24-28
	L	23 ± 2 (20-27)	31 ± 2 (27-34)	28 ± 1 (26-31)	
<b>Ventosa ventral</b>	C	26 ± 3 (21-36)	33 ± 2 (29-36)	30 ± 2 (27-33)	26-36
	L	27 ± 3 (21-36)	35 ± 1 (33-39)	31 ± 2 (27-34)	

#### 5.1.2.4- Echinostomatidae gen. sp. 1 (Echinostomatoidea: Echinostomatidae)

Localidade: Belo Horizonte, Betim, Contagem, Minas Gerais e São Luís, Maranhão-Brasil

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria glabrata*, *B. occidentalis* e *B. straminea*

##### 5.1.2.4.1- Caracterização morfológica

Cercária de corpo ovalado (Figura 13). Tegumento com pequenos espinhos. Colar cefálico formado por 27 espinhos, sendo 4 angulares. Ventosa oral arredondada, subterminal. Corpo pré faríngeo após a ventosa oral com dois grânulos refringentes. Pré-faringe curta. Faringe alongada, muscular. Esôfago longo. Cecos intestinais que alcançam a região posterior do corpo. Ventosa ventral levemente pós equatorial. Células cistogênicas abundantes, exceto nas proximidades da ventosa oral. Canais excretores principais com aproximadamente 47 concreções circulares pequenas. Cauda simples de comprimento maior que o corpo, sem membrana natatória. As medidas das cercárias de Echinostomatidae gen. sp. 1 obtidas no presente estudo são apresentadas na Tabela 8.

##### 5.1.2.4.2- Estudo molecular

Na análise do marcador nuclear 28S (Figura 14), foram obtidas sequências para 3 isolados coletados em Belo Horizonte, Betim e Contagem (1087 para Belo Horizonte e 1200 pb para Betim e Contagem). O alinhamento final apresentou 1152 pb. Os isolados de Echinostomatidae gen. sp. 1 obtidos de *Biomphalaria glabrata* formaram um clado isolado e bem suportado de outras espécies da família Echinostomatidae incluídas para comparação [*Petasiger*, *Drepanocephalus* (ambas com 27 espinhos) e *Neopetasiger*]. A divergência nucleotídica com relação às espécies dos gêneros *Drepanocephalus* e *Neopetasiger* foram de 2-2,4%, e em relação a *Petasiger* spp. foi de 2,3-4%. Na análise com o marcador mitocondrial *Nad-1* (Figura 15), contendo isolados de Belo Horizonte (439 pb) e São Luiz (498 pb), foi obtido um alinhamento final de 410 pb. Novamente, os isolados de Echinostomatidae gen. sp. 1 agruparam num mesmo clado, com bom suporte, apresentando entre si uma divergência molecular de 1,2%, indicando coespecificidade. Quando comparamos com sequências disponíveis para espécies de *Petasiger*,

*Drepanocephalus* e *Neopetasiger*, as diferenças nucleotídicas foram significativas (23,1-31,2%), (Anexo 2: Tabelas 4 e 5). Adicionalmente, a comparação com a região ITS2, com *Petasiger variospinosus* (Odhner, 1910) oriundo da África do Sul, que apresenta cercárias com características similares às deste estudo, revelou divergência de 4,8%. Além disso, estas espécies agruparam-se em clados diferentes (Figura 16), (Anexo 2: Tabela 6). Os dados moleculares obtidos revelam que os isolados de Echinostomatidae gen. sp. 1 não podem ser associados a nenhum dos gêneros da família Echinostomatidae disponíveis para comparação.

#### 5.1.2.4.3- Comentários taxonômicos

Larvas com morfologia similar à apresentada neste estudo, foram inicialmente encontradas em *B. glabrata* e descritas como *Cercaria granulifera* por LUTZ (1924). Larvas semelhantes encontradas em *Biomphalaria* spp. foram relatadas no Brasil por RUIZ (1952a) e JOE & BASCH (1967) e na Argentina por OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.* (1990,1991) e FERNANDEZ *et al.* (2014). Estudos experimentais realizados por LUTZ (1924) resultaram na associação de *Cercaria granulifera* com *Paryphostomum segregatum* Dietz, 1909. As larvas destes parasitos se encistaram em girinos e peixes e se desenvolveram em adultos em falcões, corujas e abutres infectados experimentalmente. Mais tarde, RUIZ (1952a) acrescentou informações sobre a morfologia das cercárias. Finalmente JOE & BASCH (1967), também desenvolveram o ciclo de *P. segregatum*, descrevendo cada estágio de vida. Recentemente TKACH *et al.* (2016), colocaram o gênero *Paryphostomum* Dietz, 1909 em sinonímia com *Petasiger* Dietz 1909. A espécie anteriormente considerada como tipo do gênero *Paryphostomum radiatum* (Dujardin, 1845), atualmente *Petasiger radiatus*, não se agrupou com as amostras avaliadas no presente estudo. Embora estudos baseados em parasitos adultos sejam necessários, é possível que os isolados anteriormente identificados como *P. segragatum* na América do Sul pertençam a um novo gênero.

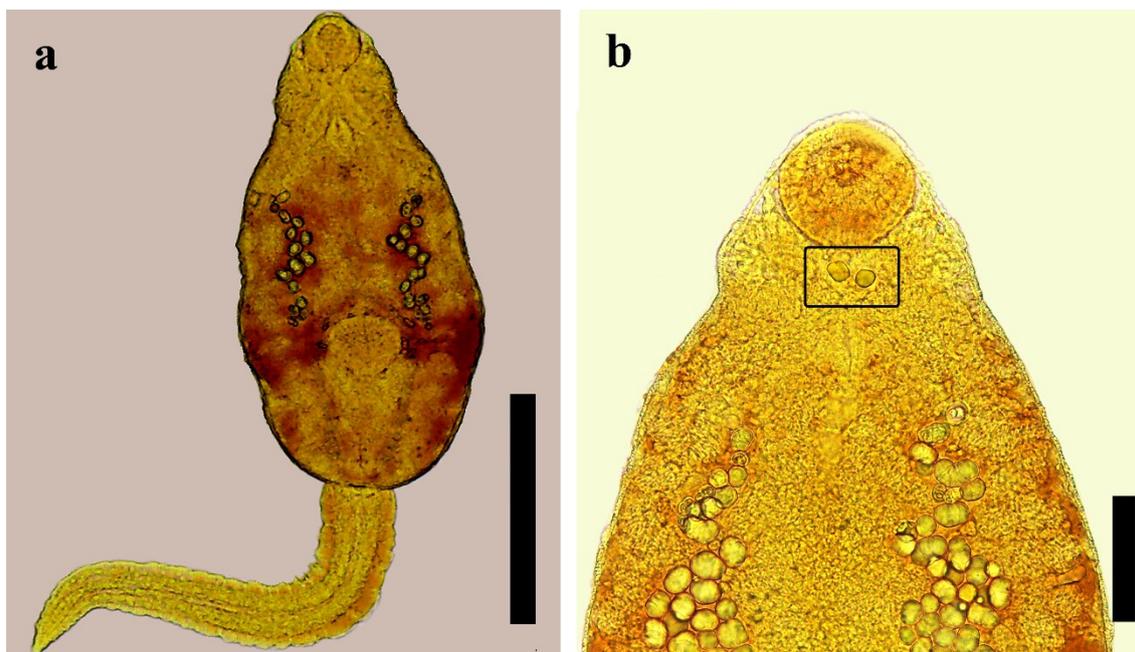


FIGURA 13- Echinostomatidae gen. sp. 1 (a) Cercária emergida de exemplares de *Biomphalaria occidentalis* naturalmente infectada em Betim, Minas Gerais (b) Detalhe do corpo da cercária mostrando os grânulos refringentes na base da ventosa oral. Escalas: 200  $\mu\text{m}$  (a), 50  $\mu\text{m}$  (b)

TABELA 8- Dados morfométricos das cercárias de Echinostomatidae gen. sp. 1, encontradas em *B. glabrata* e *B. straminea* em Belo Horizonte, Betim e Contagem, MG e os dados de cercárias similares

<b>Espécie</b>		<b>Echinostomatidae gen. sp. 1</b>	<b><i>Paryphostomum segregatum</i></b>	<b><i>Paryphostomum segregatum</i></b>	<b><i>Petasiger variospinosus</i></b>	<b>Echinocercaria sp. III</b>	<b>Echinocercaria sp. XVI</b>
<b>Localidade Hospedeiro</b>		Brasil <i>Biomphalaria occidentalis</i>	Brasil <i>Biomphalaria spp.</i>	Brasil <i>Biomphalaria spp.</i>	África do Sul <i>Bulinus tropicus</i>	Argentina <i>B. occidentalis</i>	Argentina <i>B. straminea</i>
<b>Referência</b>		Presente estudo	RUIZ (1952a)	JOE & BASCH (1967)	KING & VAN AS (2000)	OSTROWSKI DE NÚÑEZ <i>et al.</i> (1991)	FERNANDEZ <i>et al.</i> (2014)
<b>Corpo</b>	C	238 ± 18 (213-270)	215-245	205-234	387 ± 46 (300-440)	326 ± 42 (270-440)	198 (116-227)
	L	125 ± 9 (106-135)	-	92-118	215 ± 31 (172-265)	197 ± 51 (120-280)	110 (92-122)
<b>Cauda</b>	C	479 ± 15 (454-503)	430	380-435	523 ± 71 (397-669)	483 ± 79 (360-600)	398 (306-448)
	L	43 ± 5 (36-50)	-	34-40	63 ± 11 (44-77)	49 ± 9 (30-80)	42 (30-48)
<b>Ventosa Oral</b>	C	36 ± 1 (36-39)	37-47	32-36	55 ± 10 (37-68)	48 ± 9 (40-70)	29 (25-32)
	L	36 ± 1 (36-39)	-	35-40	56 ± 21 (37-67)	49 ± 9 (40-70)	30 (23-34)
<b>Ventosa Ventral</b>	C	40 ± 4 (36-45)	47-62	37-48	67 ± 9 (51-90)	57 ± 8 (50-70)	30 (21- 34)
	L	42 ± 4 (36-46)	-	-	75 ± 10 (61-94)	57 ± 8 (50-70)	34 (28-41)
<b>Faringe</b>	C	20 ± 4 (14-27)	18	12-16	30 ± 6 (21-44)	-	16 (14-18)
	L	10 ± 2 (7-13)	-	12-15	19 ± 3 (14-23)	-	12 (11-14)

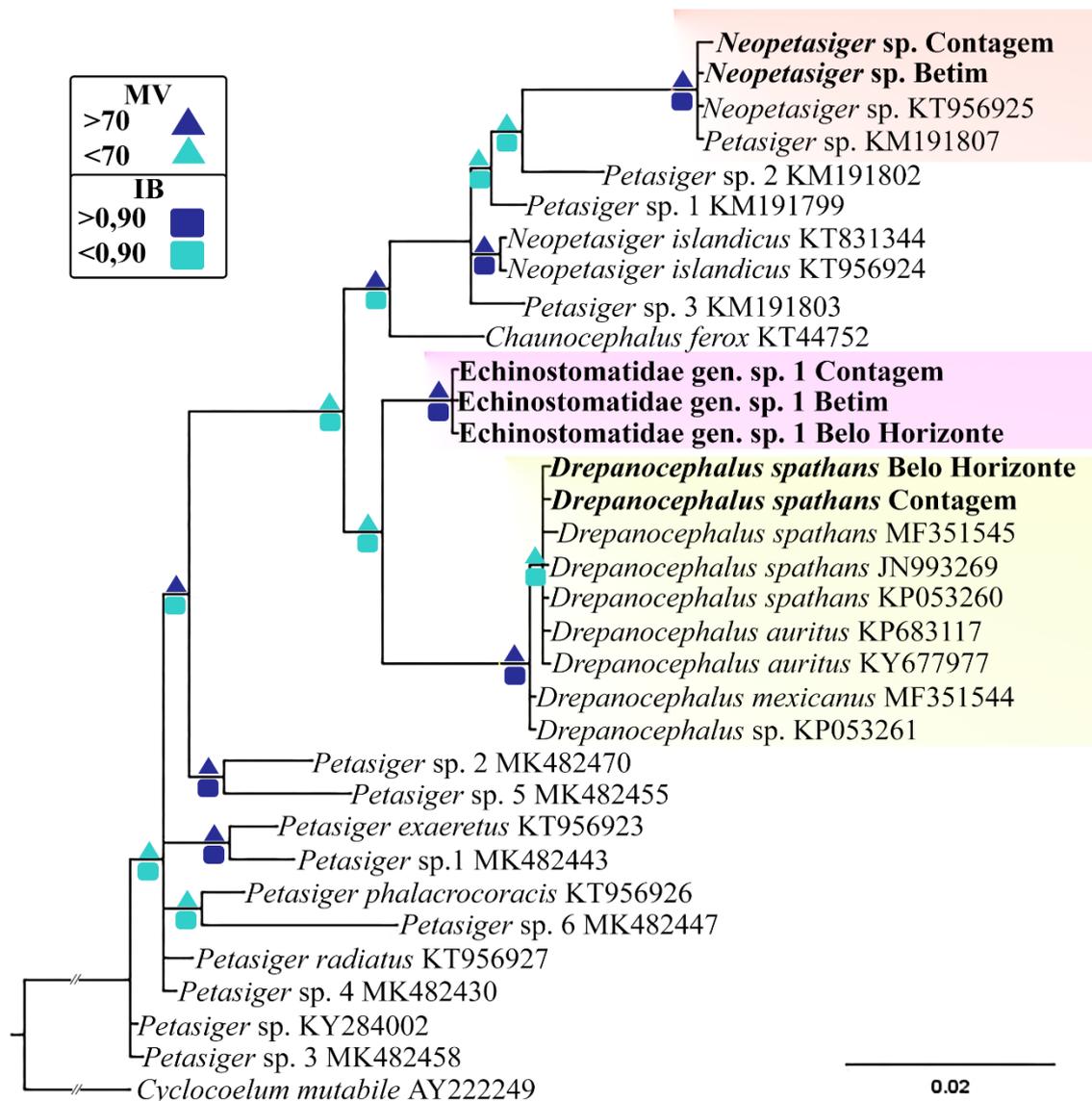


FIGURA 14- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene 28S de cercárias identificadas como *Drepanocephalus spathans*, *Neopetasiger* sp. e Echinostomatidae gen. sp. 1 (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo TN93+G+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (□) e bootstrap (△), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Cyclocoelum mutabile* foi usado como grupo externo.

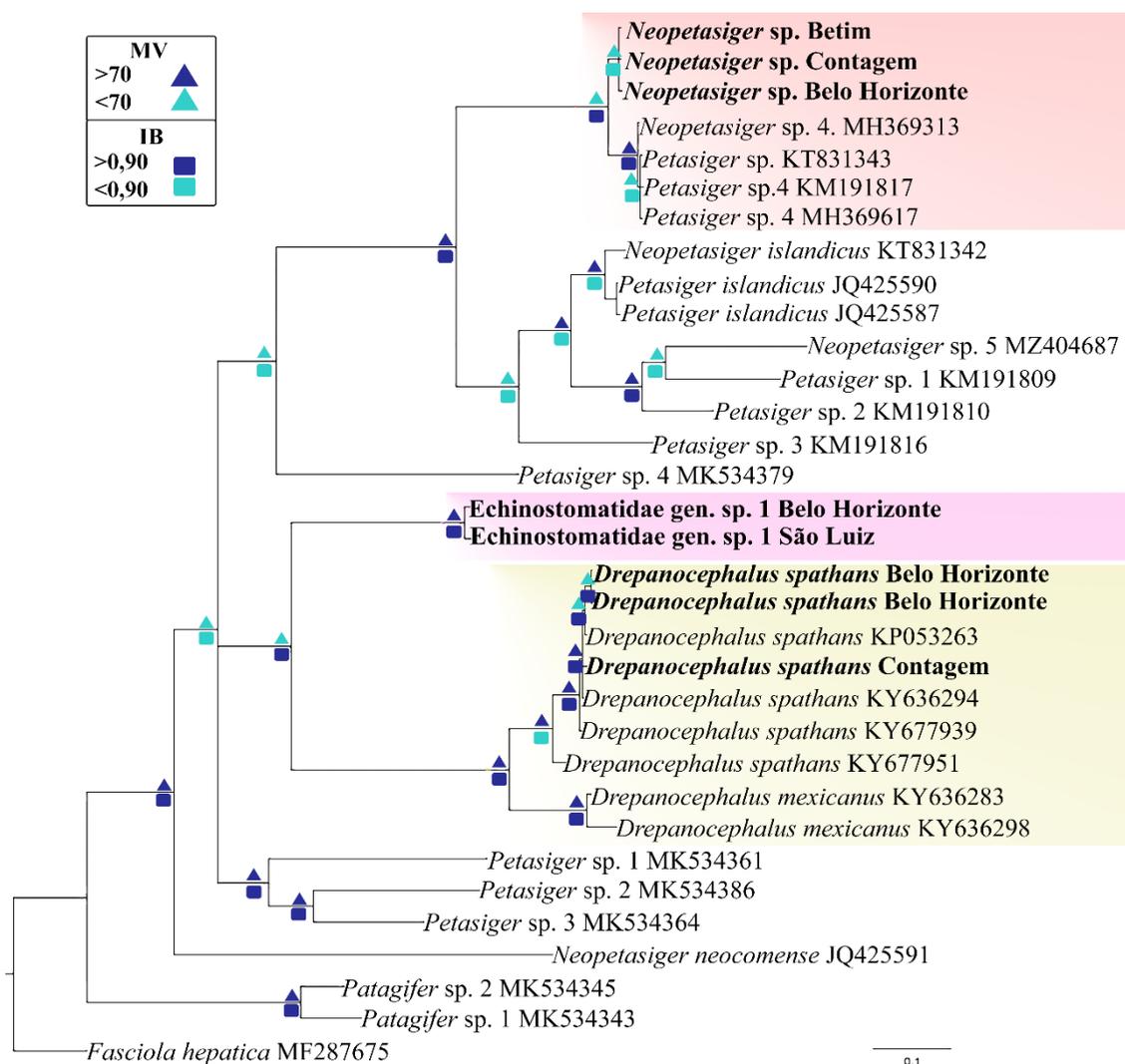


FIGURA 15- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene mitocondrial *Nad-1* de cercárias identificadas como *Drepanocephalus spathans*, *Neopetasisger* sp. e Echinostomatidae gen. sp. 1 (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+G. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Fasciola hepatica* foi usado como grupo externo.

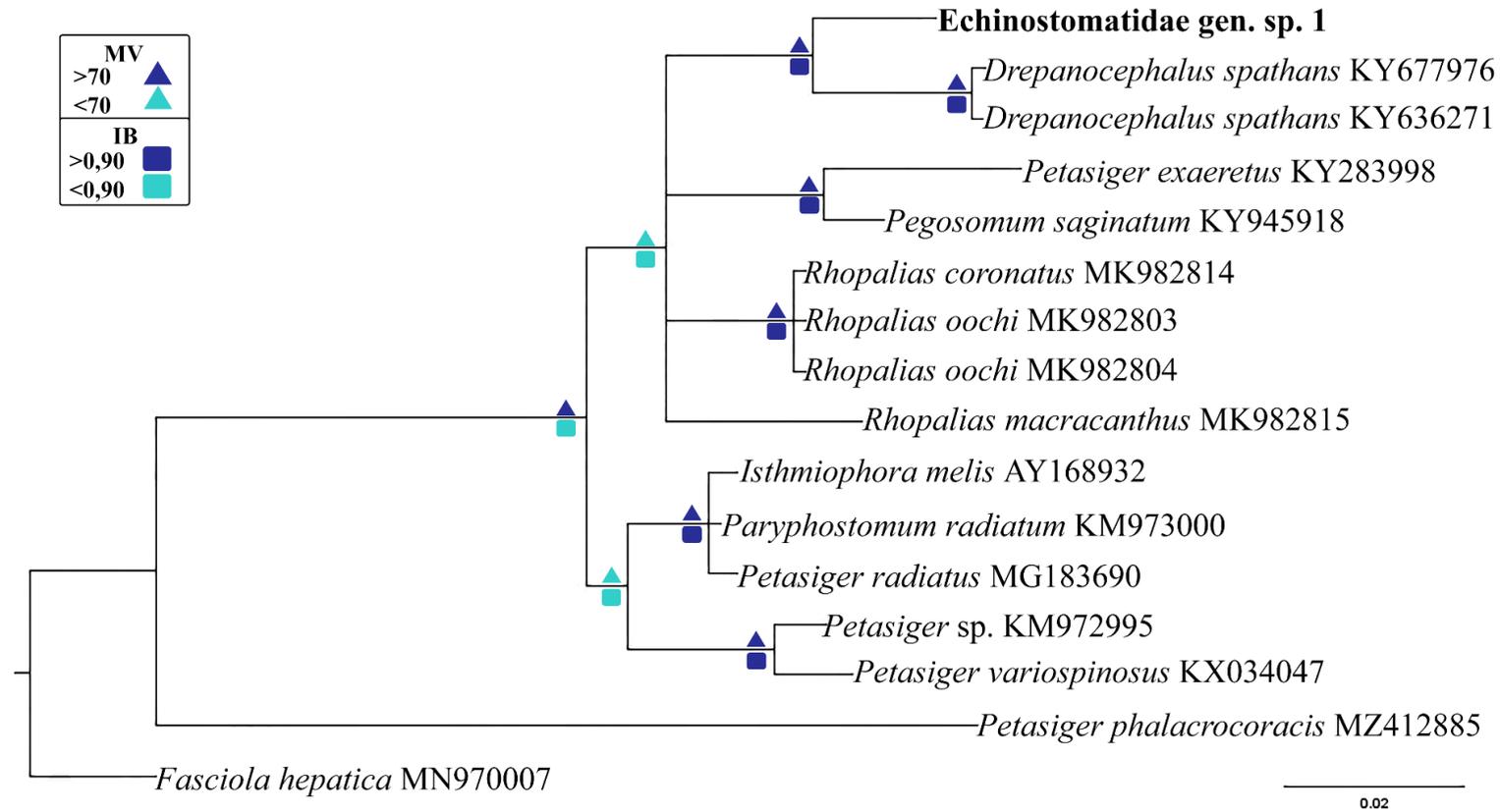


FIGURA 16-Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região transcrita interna 2 (ITS2) de cercárias identificadas como *Echinostomatidae* gen. sp. 1, no Brasil (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore foi inferida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando o modelo K2+G, sendo suporte dos nós fornecido pelos valores de probabilidade posterior. Valores dos nós para MV são representados com ▲ e para IB como ■. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Fasciola hepatica* foi usado como grupo externo.

#### 5.1.2.5- Echinostomatidae gen. sp. 2 (Echinostomatoidea: Echinostomatidae)

Localidade: Januária, Minas Gerais, Brasil

Primeiro hospedeiro intermediário: *Pomacea* sp.

##### 5.1.2.5.1- Caracterização morfológica

Corpo ovalado (Figura 17). Colar cefálico com 31 espinhos em uma fileira única. Ventosa oral arredondada, subterminal. Pré-faringe curta. Faringe muscular, alongada. Esôfago relativamente longo. Cecos que alcançam a região posterior do corpo. Ventosa ventral esférica, maior que a ventosa oral, equatorial. Dois tipos de células cistogênicas: uma localizada em ambos os extremos do corpo e outro, na região central do corpo, ao nível esofágico. Vesícula excretora sacular. Canais excretores principais se estendem até a ventosa oral com aproximadamente 35 concreções circulares. Cauda simples com membrana natatória em toda a sua extensão. Os dados morfométricos das cercárias de Echinostomatidae gen. sp. 2 do presente estudo são apresentadas na tabela 9.

##### 5.1.2.5.2- Estudo molecular

A topologia da árvore filogenética obtida para 28S (Figura 20) revelou que Echinostomatidae gen. sp. 2 agrupa-se com outra espécie avaliada no presente estudo e Echinostomatidae gen. sp. 4. A diferença com relação a este isolado foi de 2,3%. Contudo, a inclusão desta espécie no gênero *Echinostoma* não encontra suporte filogenético, uma vez que não se verificou o agrupamento no clado contendo as espécies deste gênero. A divergência molecular entre o isolado aqui reportado e *Echinostoma* spp. foi de 2,3-3,9 % (Anexo 2: tabela 7). Com relação ao marcador mitocondrial *Nad-1*, na árvore filogenética (Figura 21) não foi observado nenhum agrupamento com as sequências disponíveis. Quando comparada com as outras sequências do gênero *Echinostoma* as divergências variavam de 15,7-23% e com relação ao gênero *Echinoparyphium* a variação foi de 19,5-24,2% (Anexo 2: Tabela 8).

##### 5.1.2.5.3- Comentários taxonômicos

A morfologia e morfometria dos estágios evolutivos obtidos foram comparadas

com descrições já existentes, possibilitando a identificação de Echinostomatidae gen. sp. 2, aqui relatado pela primeira vez em Minas Gerais. A análise morfológica, dessas larvas revelaram similaridades com *Echinostoma parcespinosum* Lutz, 1924. Esta espécie já foi reportada em aves na Argentina, Brasil e Venezuela (FERNANDES *et al.*, 2015). LUTZ (1924), elucidou o ciclo biológico de *E. parcespinosum* através de uma infecção experimental iniciada a partir de cercárias obtidas em moluscos ampularídeos. Mais tarde, MACHADO & SAMPAIO (1980) também estudaram experimentalmente o desenvolvimento deste parasito em *Pomacea lineata*, no estado de São Paulo no Brasil. Finalmente, MARTORELLI (1987) elucidou o ciclo biológico de *E. parcespinosum* na Argentina, onde *Pomacea canaliculata* foi registrado como molusco hospedeiro intermediário. Adicionalmente, outra larva com morfologia similar foi relatada por NASIR (1964a), na Venezuela, quem a identificou como *Echinostoma donosoi* Nasir, 1964, sendo outro ampularídeo, *Marisa cornuarietis*, relatado como primeiro hospedeiro intermediário. Diante do resultado molecular apresentado, uma análise mais detalhada se faz necessária para se avaliar se de fato há suporte morfológico para a inclusão de *E. parcespinosum* no gênero *Echinostoma* ou se na verdade trata-se de um novo gênero de Echinostomatidae

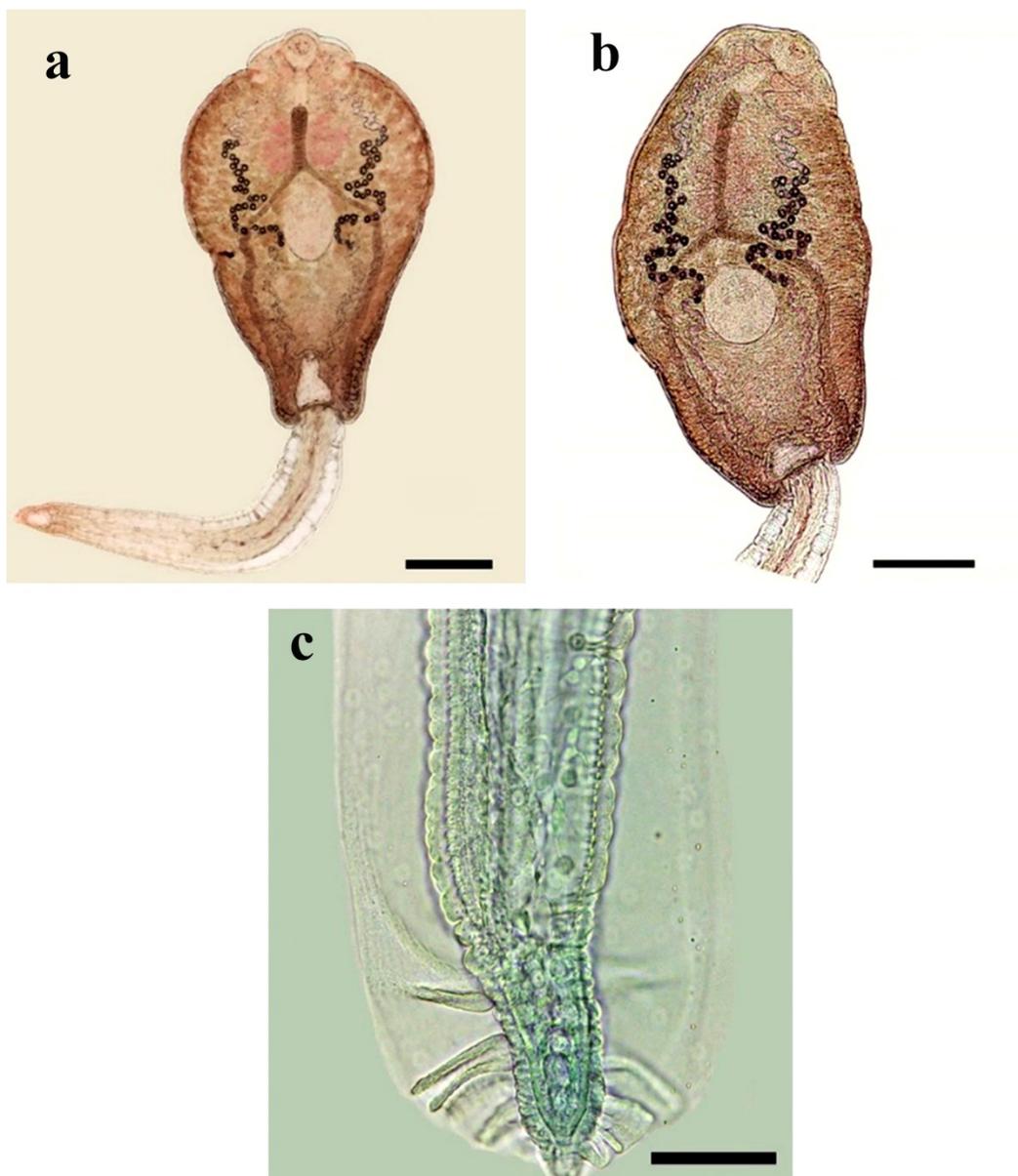


FIGURA 17- Echinostomatidae gen. sp. 2. (a) Cercária emergida de exemplar de *Pomacea* sp. coletada em Januária, Minas Gerais. (b) Detalhe do corpo da cercária. (c) Detalhe da cauda. Escalas: 200  $\mu\text{m}$  (a, b), 50  $\mu\text{m}$  (c).

TABELA 9- Dados morfométricos de cercárias de Echinostomatidae gen. sp. 2, encontradas em *Pomacea* sp. em Januária, Minas Gerais, Brasil, e medidas apresentadas por outros autores

Espécie		<b>Echinostomatidae gen. sp. 2</b> Brasil	<i>Echinostoma parcespinosum</i> Argentina	<i>Echinostoma parcespinosum</i> Brasil	<i>Echinostoma donosoi</i> Venezuela
Localidade					
Hospedeiro		<i>Pomacea</i> sp.	<i>Ampularia canaliculata</i>	<i>Pomacea lineata</i>	<i>Marisa cornuarietis</i>
Referência		Presente estudo	MARTORELLI (1987)	MACHADO & SAMPAIO (1980)	NASIR (1964a)
<b>Corpo</b>	C	655±68(543-798)	820-960	1272,73	528-721
	L	341±26(300-400)	390-510	854,55	286-403
<b>Ventosa Oral</b>	C	77±7(67-99)	80-100	-	57-75
	L	67±8(41-74)	80-100	-	
<b>Faringe</b>	C	36±3(32-43)	-	-	39-45
	L	29±5(18-35)	-	-	27-39
<b>Ventosa Ventral</b>	C	131±12(100-150)	170-180	-	99-123
	L	122±11(93-136)	170-180	-	87-108
<b>Cauda</b>	C	910±63(762-980)	771,7	1818,2	650-858
	L	116±21(57-144)	93,3	254,6	91-117
<b><i>Metacercária</i></b>					
<b>Cisto</b>	C	377±36(338-464)	330-350	756,76	
	L	331±19(293-364)	-	-	
<b>Parede</b>		22±11(8-47)	-		

#### 5.1.2.6- Echinostomatidae gen. sp. 3 (Echinostomatoidea: Echinostomidae)

Localidade: Contagem, Minas Gerais, Brasil.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria straminea*.

##### 5.1.2.6.1- Caracterização morfológica

Corpo ovalado (Figura 18). Ventosa oral subterminal. Corpo pré- faringeal se sobrepõe à região posterior da ventosa oral, sem espinhos. Pré-faringe ausente. Faringe alongada, muscular. Colar de espinhos ininterrompido com 37 espinhos. Esôfago longo. Cecos intestinais longos, alcançando a região posterior do corpo. Células cistogênicas abundantes, com conteúdo em forma de barra, na região lateral do corpo. Glândulas de penetração disposta medialmente na região do esôfago. Ventosa ventral esférica, levemente pós-equatorial. Vesícula excretora globular, situada na região posterior do corpo. Canais excretores principais que vão desde a metade da região acetabular até a faringe, com numerosas concreções circulares (aproximadamente 50) que se tornam menores a medida em que se aproximam da faringe. Cauda simples, com membrana natatória presente na porção final. As medidas das cercárias de Echinostomatidae gen. sp. 3 do presente estudo são apresentadas na Tabela 10.

##### 5.1.2.6.2- Estudo molecular

A análise com o marcador 28S (Figura 20) resultou em um alinhamento final de 1219 pb. Foram utilizadas para comparação sequências dos gêneros *Echinostoma*, *Echinoparyphium* e *Euparyphium*. A espécie em estudo não se agrupou com nenhuma das outras espécies de Echinostomatidae incluídas na comparação, especialmente aquelas do gênero *Echinostoma* pertencentes ao grupo “*revolutum*”, que também apresentam 37 espinhos no colar cefálico. A divergência molecular deste isolado em relação às outras sequências foi de 4,2-5,8%. No caso da análise com o marcador mitocondrial *Nad-1* (Figura 21), os resultados das análises filogenéticas foram semelhantes com os obtidos com o marcador nuclear, não sendo verificado agrupamento que suportasse a identificação do gênero. Foram verificadas divergências nucleotídicas de 17,6-24,4% em relação aos outros isolados de Echinostomatidae utilizados para comparação (Anexo 2: Tabelas 7 e 8).

#### 5.1.2.6.3- Comentários taxonômicos

As larvas aqui identificadas como Echinostomatidae gen. sp. 3 apresentaram similaridade com cercárias de 37 espinhos no colar cefálico descritas por FERNANDEZ *et al.* (2014) como Echinocercaria sp. XIV, encontrado e, *B. straminea* na Argentina, e *Echinostoma* sp. 2 em *B. tenagophila* em Uruguai (MARTORELLI, 2003). Porém, difere das larvas relatadas na Argentina e Uruguai, por não possuir espinhos no corpo pré-faringeal. Além disso, possui menor número de concreções circulares nos tubos principais do sistema excretor (aproximadamente 50 x 84-112). Estas duas larvas também apresentam corpo pré-faringeal semelhante ao aqui relatado. Além desta estrutura, a cercária aqui caracterizada difere de outras larvas com 37 espinhos, em especial pertencentes ao gênero *Echinostoma* Rudolphi, 1809, pela disposição das membranas natatórias (*fin-folds*). Os resultados moleculares obtidos sugerem tratar-se de uma espécie de um gênero que ainda não possui sequências disponíveis para comparação.

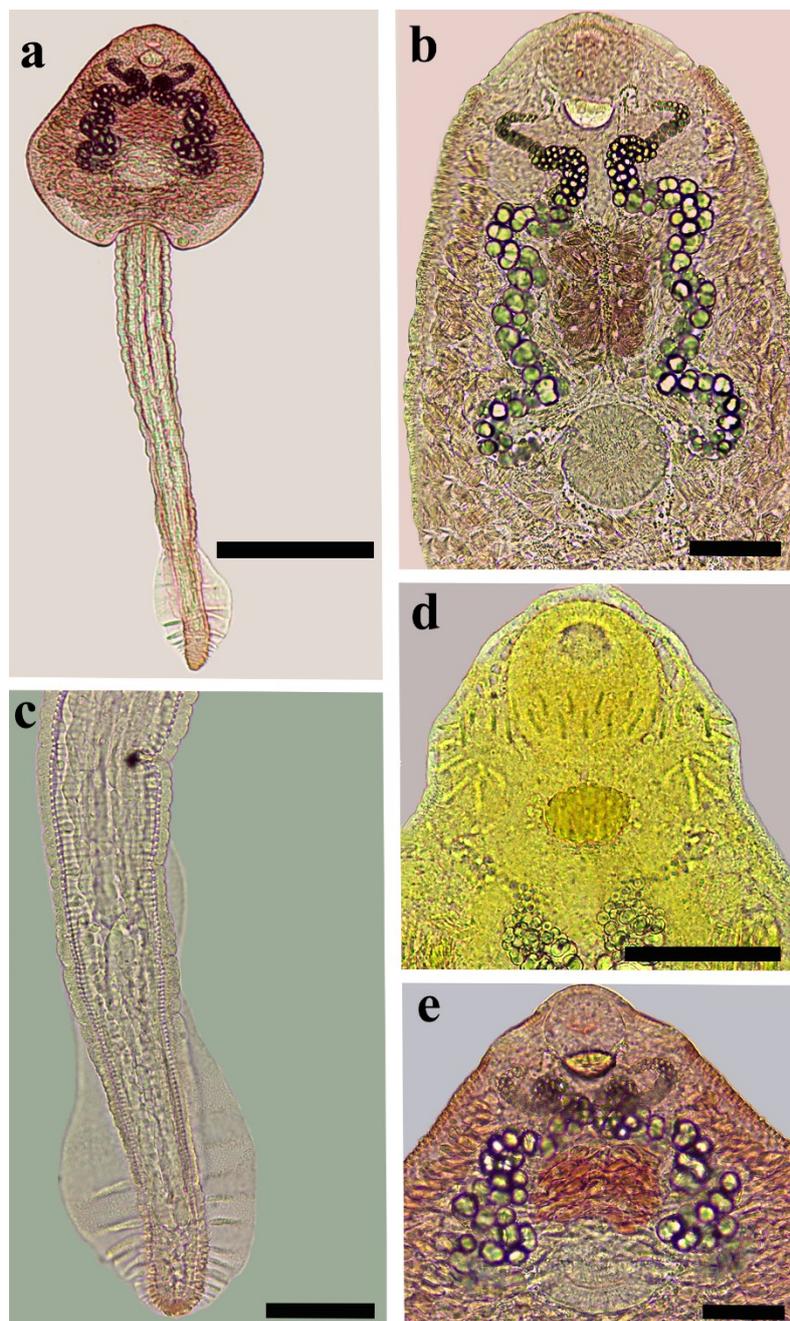


FIGURA 18- Echinostomatidae gen. sp. 3. (a) Cercária emergida de exemplar de *Biomphalaria straminea* coletada em Contagem, Minas Gerais. (b) Detalhe do corpo da cercária (c) Detalhe da cauda com membrana natatória. (d) Detalhe do colar de espinhos em lugol (e) Detalhe do órgão prefaringeal e glândulas de penetração entre a faringe e ventosa ventral em vermelho neutro. Escalas: 200 µm (a), 50 µm (b, c,d,e).

TABELA 10- Dados morfométricos de cercárias de Echinostomatidae gen. sp. 3 encontradas em *Biomphalaria straminea*. em Contagem, Minas Gerais, Brasil, e medidas de larvas semelhantes apresentadas por outros autores

<b>Espécie</b>		<b>Echinostomatidae gen. sp. 3</b>	<b>Echinostoma sp. 2</b>	<b>Echinocercaria sp. XIV</b>
<b>Localidade</b>		Brasil	Argentina	Argentina
<b>Hospedeiro</b>		<i>B. straminea</i>	<i>B. tenagophila</i>	<i>B. straminea</i>
<b>Referência</b>		Presente estudo	MARTORELLI (2003)	FERNANDEZ <i>et al.</i> (2014)
<b>Corpo</b>	C	299±11(277-312)	413±31 (370-440)	310±25 (270-366)
		130±7(113-141)	197±5(190-200)	187±22 (138-222)
<b>Cauda</b>	L	587±28(539-645)	337±63 (250-400)	566±37 (480-642)
		46±5(36-64)	46±5 (59-49)	49±5 (42-60)
<b>Ventosa oral</b>	C	36±1(36-39)	55±4 (50-60)	41±4 (34-46)
	L	36±1(36-39)	55±4 (50-60)	39±5 (32-46)
<b>Ventosa ventral</b>	C	53±3 (46-57)	70± (60-80)	49±5 (44-62)
	L	53±2(50-55)	70± (60-80)	52±6 (46-69)
<b>Órgão prefaríngeal</b>	C	11±2(9-16)	-	15±2 (14-21)
	L	16±2(13-21)	-	22±1 (18-23)
<b>Faringe</b>	C	27±0 (27)	-	21±2 (18-23)
	L	8±1(7-9)	-	15±2 (11-18)

#### 5.1.2.7- Echinostomatidae gen. sp. 4 (Echinostomatoidea: Echinostomatidae)

Localidade: Januária, Minas Gerais, Brasil.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria glabrata*.

##### 5.2.2.7.1- Caracterização morfológica

*Cercária*: cercária grande, corpo ovalado, alongado (Figura 19a-b). Colar cefálico armado com 47 espinhos. Ventosa oral subterminal, esférica, muscular. Pré-faringe curta. Faringe muscular, arredondada. Não foi possível observar a existência do esôfago e cecos intestinais devido ao grande número de células associadas ao sistema excretor que se ramificam ocupando praticamente o corpo inteiro. Ventosa ventral esférica, pós equatorial de maior tamanho que a ventosa oral. Cauda simples, com membrana natatória que se estende desde a metade da cauda até a extremidade posterior.

A morte do molusco pouco tempo após a análise impossibilitou, uma caracterização morfométrica mais detalhada, sendo as medidas de apenas uma cercária fotografada apresentada na Tabela 11.

*Metacercária*: cisto grande,  $749 \pm 160$  (541-1001) x  $644 \pm 72$  (559-644), com paredes finas  $20 \pm 7$  (8-27), contendo uma larva bastante desenvolvida. Corpo da metacercária desencistada alongado,  $2042 \pm 641$  (1529-3295) x  $586 \pm 146$  (401-728), (Figura 19c-e). Colar cefálico com 47 espinhos  $519 \pm 134$  (364-710) x  $737 \pm 121$  (546-837). Ventosa oral subterminal, arredondada,  $127 \pm 22$  (106-156) x  $135 \pm 20$  (106-156). Pré-faringe não observada. Faringe muscular, alongada  $147 \pm 31$  (106-177) x  $92 \pm 19$  (71-113). Esôfago longo,  $173 \pm 43$  (106-213) x  $30 \pm 15$  (14-50). Cecos intestinais longos, se estendendo até a região final do corpo. Ventosa ventral grande, arredondada, maior que a ventosa oral, pré-equatorial,  $334 \pm 55$  (284-425) x  $366 \pm 58$  (284-425). Testículos em tandem, com bordas irregulares, pós ovarianos [Testículo superior:  $115 \pm 57,7$  (57-220) x  $183 \pm 87$  (71-284), Testículo inferior:  $137 \pm 47$  (71-213) x  $169 \pm 85$  (71-284)]. Vesícula seminal pouco desenvolvida. Ovário pré-testicular, de forma variável  $65 \pm 40$  (36-142) x  $148 \pm 40$  (57-248). Útero com poucas voltas, sem ovos.

#### 5.1.2.7.2- Estudo molecular

Um fragmento do gene 28S de 1134 pb foi obtido e incluído nas análises, sendo as análises baseadas em um alinhamento final de 1219 pb (Figura 20). Como resultado, Echinostomatidae gen. sp. 4 não agrupou com nenhum dos gêneros da família Echinostomatidae utilizados para comparação. Divergências moleculares de 2,1-3,5% foram verificadas em relação aos gêneros *Echinostoma*, *Echinoparyphium* e *Euparyphium*. A espécie com maior proximidade foi Echinostomatidae gen. sp. 2 aqui caracterizada, com quem se agrupou e apresentou uma divergência nucleotídica de 2,2%. Os resultados obtidos com o marcador mitocondrial *Nad-1* (Figura 21) também não revelaram agrupamento de Echinostomatidae gen. sp. 4 com nenhum dos gêneros incluídos nas análises (divergências nucleotídicas de 19,5-26,6%) (Anexo 2: Tabelas 7 e 8).

#### 5.1.2.7.3- Comentários taxonômicos

A larva de 47 espinhos no colar cefálico avaliadas no presente estudo foi identificada como Echinostomatidae gen. sp. 4 e apresentou similaridades morfológicas com a Echinocercaria sp. IV relatada em *Biomphalaria occidentalis*, *B. orbiyi*, *B. peregrina*, *B. tenagophila* e *B. straminea* na Argentina (OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.*, 1997; FERNANDEZ *et al.* 2016). A medida da única cercária fotografada e das rédias são, em linhas gerais, compatíveis com estes isolados da Argentina. As similaridades estão relacionadas com o número de espinhos no colar cefálico (47), as membranas natatórias na cauda e as espécies de moluscos que parasitam. Entre os outros equinostomatídeos com colar cefálico de 47 espinhos reportados na América do Sul, há o registro de *Echinostoma* sp. em jacarés, parasitos identificados a partir da análise de espécimes coletados no país pelo naturalista austríaco Johann Natterer no século XIX (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2002). Outro gênero da família Echinostomatidae com o mesmo número de espinhos no colar cefálico é *Edietziana*, porém, dados moleculares das espécies deste gênero são inexistentes, impossibilitando a identificação. Finalmente, os dados moleculares não suportam a inclusão do parasito aqui reportado no gênero *Echinostoma*.

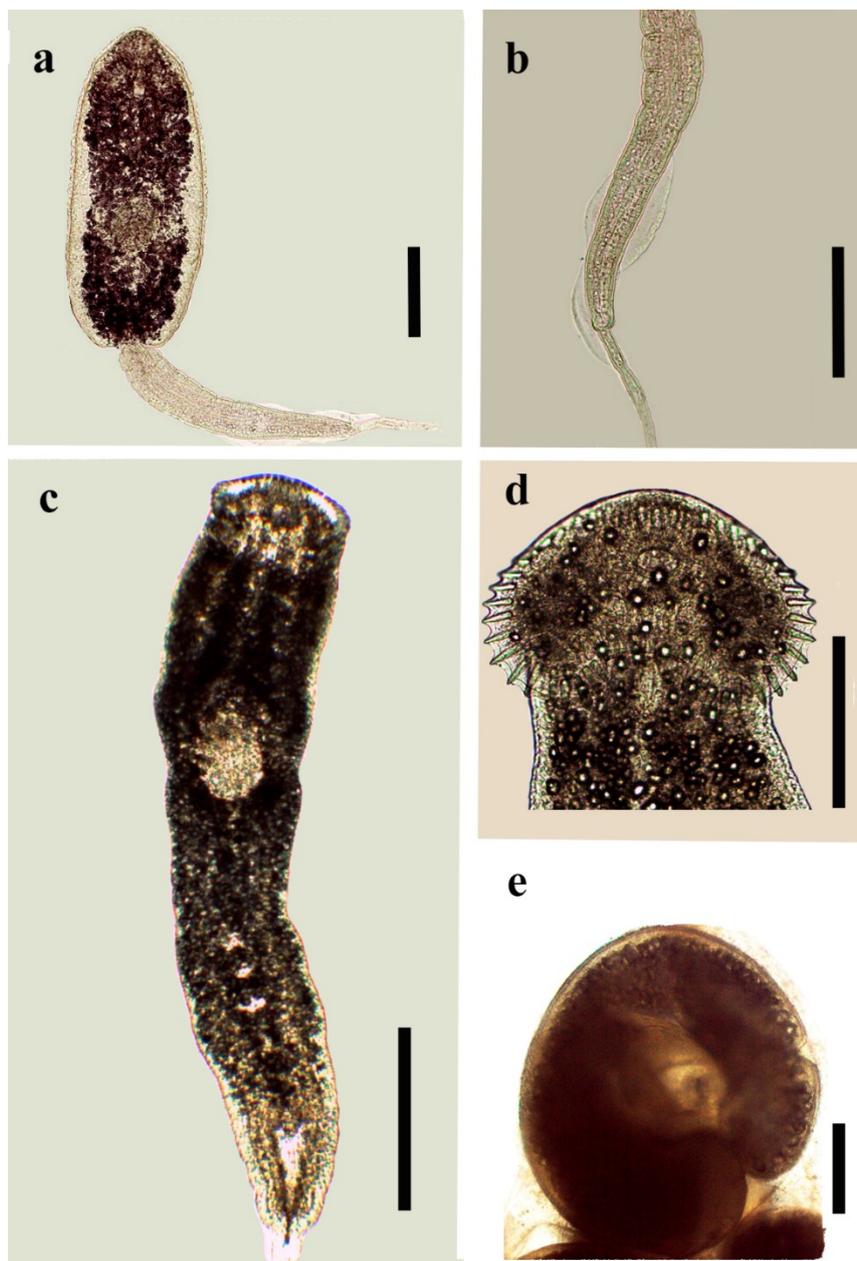


FIGURA 19- Echinostomatidae gen. sp. 4. (a) Cercária emergida de exemplar de *Biomphalaria glabrata* coletada em Januária, Minas Gerais. (b) Detalhe da cauda com membrana natatória. (c) Metacercária desencistada. (d) Detalhe do colar de espinhos. (e) Metacercária encistada encontrada em *B. glabrata*. Escalas: 200 µm (a,b,d,e), 500 µm (c).

TABELA 11- Dados morfométricos baseados em uma cercária Echinostomatidae gen. sp. 4 encontrada em *Biomphalaria glabrata* coletada em Januária, Minas Gerais Brasil, e medidas de cercárias semelhantes registradas na Argentina

<b>Espécie</b>	<b>Echinostomatidae gen. sp. 4</b>		<b>Echinocercaria sp. IV</b>
<b>Localidade</b>	Brasil		Argentina
<b>Hospedeiro</b>	<i>B. straminea</i>		<i>B. occidentalis, B. tenagophila.</i>
<b>Referência</b>	Presente estudo		OSTROWSKI DE NÚÑEZ <i>et al.</i> (1997)
<b>Corpo</b>	C	694	619 ± 41 (540-690)
	L	303	258 ± 23 (200-300)
<b>Cauda</b>	C	665	794 ± 82 (640-930)
	L	71	77 ± 7 (70-90)
<b>Ventosa oral</b>	C	81	69 ± 7 (60-90)
	L	86	69 ± 6 (60-84)
<b>Ventosa ventral</b>	C	94	88 ± 9 (72-108)
	L	96	93 ± 5 (84-102)

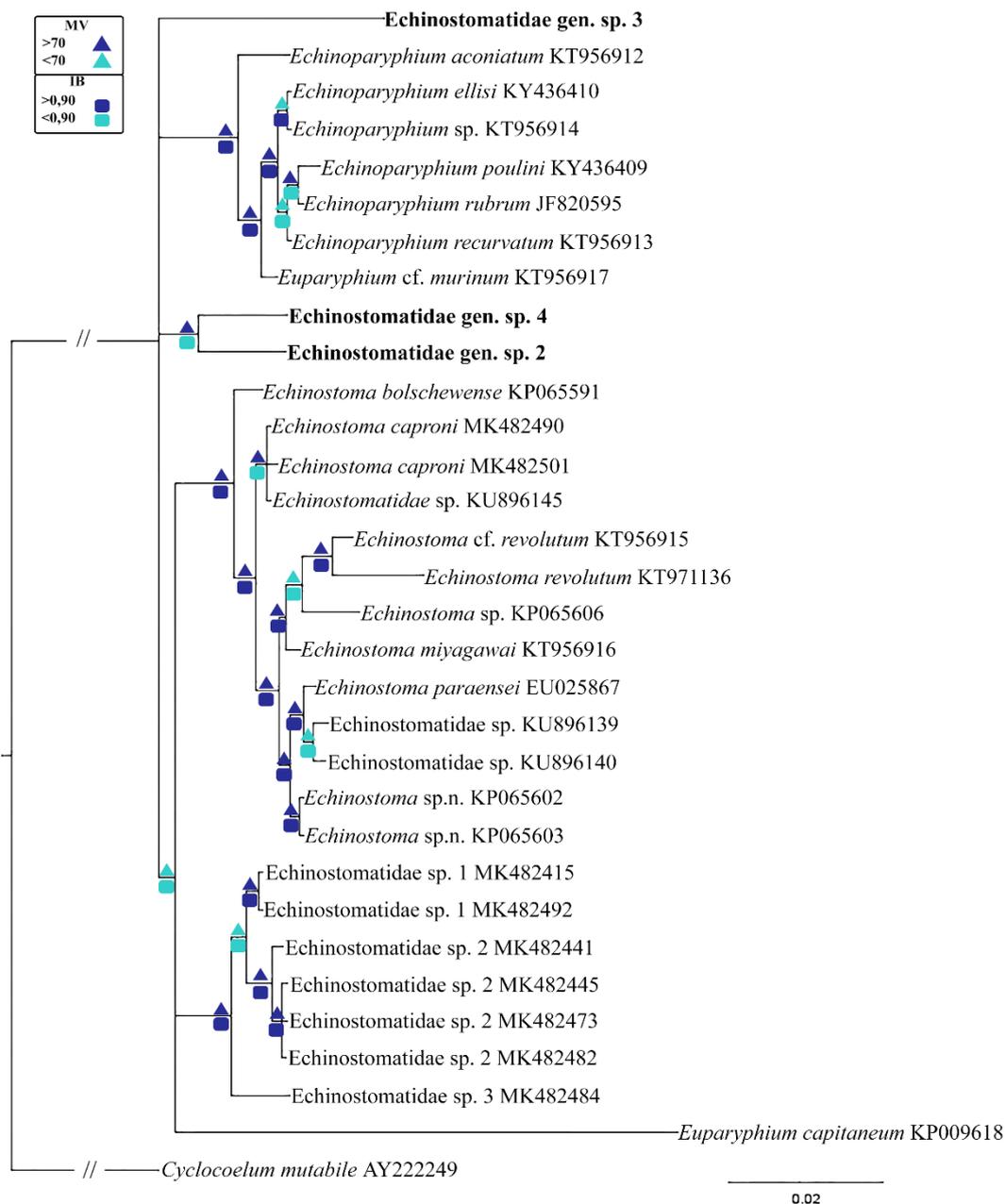


FIGURA 20- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene 28S de cercárias identificadas como *Echinostomatidae* gen. sp. 2, *Echinostomatidae* gen. sp. 3 e *Echinostomatidae* gen. sp. 4 (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo TN93+G. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (◻) e bootstrap (▲), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Cyclocoelum mutabile* foi usado como grupo externo.

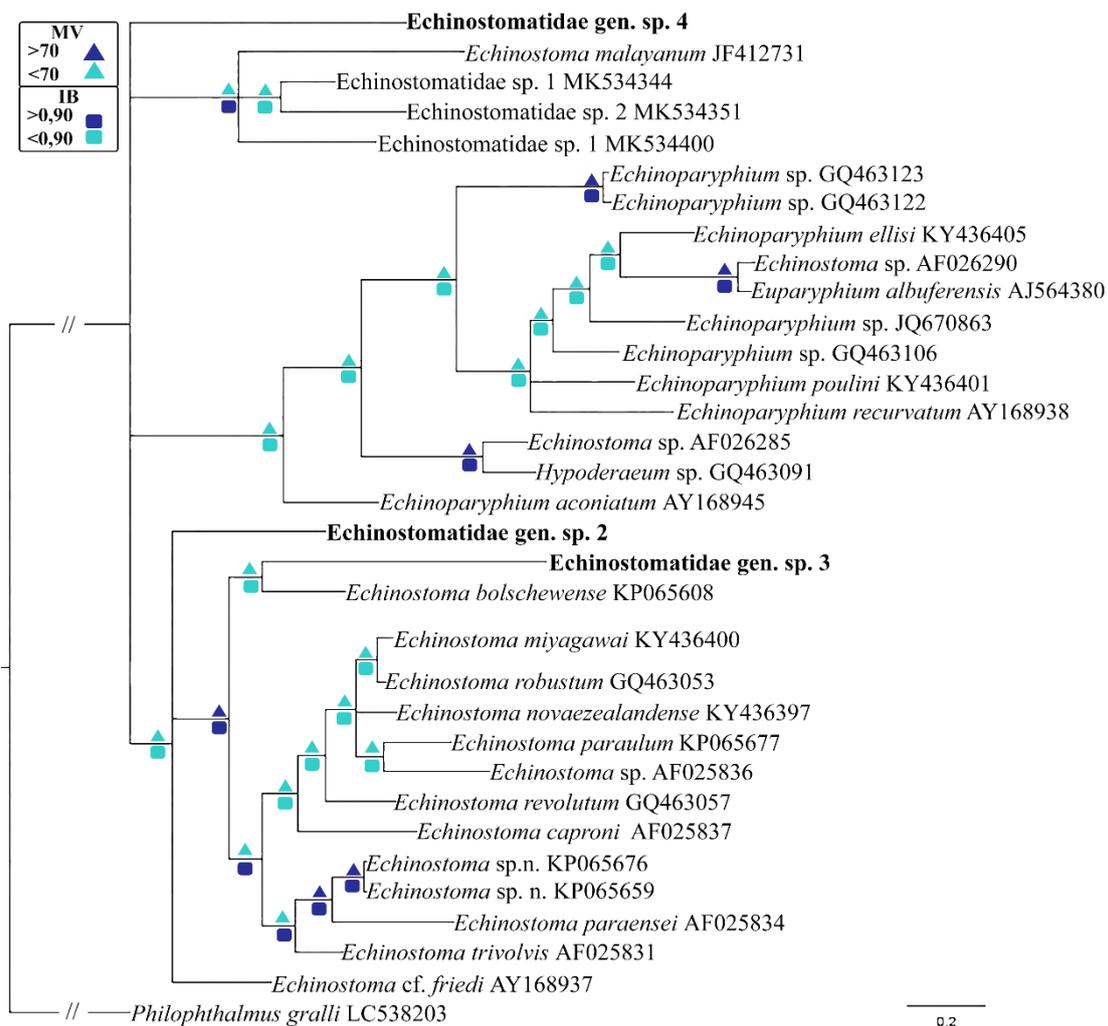


FIGURA 21- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene mitocondrial *Nad-1* de cercárias identificadas como *Echinostomatidae* gen. sp. 2, *Echinostomatidae* gen. sp. 3 e *Echinostomatidae* gen. sp. 4 (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo TN93+G+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (□) e bootstrap (△), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Philophthalmus gralli* foi usado como grupo externo.

#### 5.1.2.8- Echinostomatidae gen. sp. 5 (Echinostomatoidea: Echinostomatidae)

Localidade: Rio de Janeiro, Brasil

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria* sp.

##### 5.1.2.8.1- Caracterização morfológica

Corpo ovalado (Figura 22). Ventosa oral subterminal, esférica. Colar cefálico com 51 espinhos. Corpo pré-faringeal presente, contendo numerosos espinhos (aproximadamente 50), localizado logo após a ventosa oral. Faringe muscular, arredondada. Esôfago relativamente curto. Cecos intestinais chegam a alcançar a margem posterior do corpo, contendo células de forma circular de tamanhos variados. Ventosa ventral esférica, maior que a ventosa oral, pós equatorial. Células cistogênicas com conteúdo em forma de barra, abundantes e distribuídas pelo corpo até o nível da faringe. Tubos excretores principais bastante finos, começando ao nível da bifurcação intestinal e vão até a ventosa oral, contendo abundantes concreções circulares (aproximadamente 100), com tamanho reduzido quanto mais próximos chegam da ventosa oral. Cauda simples, com uma membrana natatória em sua região posterior. As medidas das cercárias de Echinostomatidae gen. sp. 5 do presente estudo são apresentadas na Tabela 12.

##### 5.1.2.8.2- Estudo molecular

Não foi possível obter sequências nucleotídicas destes isolados.

##### 5.1.2.8.3- Comentários taxonômicos

A larva de 51 espinhos no colar cefálico foi identificada aqui, através uma análise morfológica como Echinostomatidae gen. sp. 5. Na América do Sul, algumas larvas com características similares foram relatadas por MARTORELLI *et al.* (2013) quem identificaram como Echinostomatidae N° 3 larvas apresentando 58 espinhos no colar cefálico, obtidas em *B. tenagophila*. Além disso, OSTROWSKI DE NÚÑEZ (1974) descreveu a cercária de *Episthmium suspensum* (Braun, 1901) Travassos, 1922, mas, com algumas diferenças morfométricas e morfológicas em relação à larva do presente estudo.

Mais recentemente na África, algumas cercárias foram identificadas por LAIDEMITT *et al.* (2019) como pertencentes ao gênero *Patagifer*. Estas apresentam algumas similaridades das larvas encontradas no Brasil, como o número de espinhos no colar, presença da roseta de espinhos e número de corpúsculos calcáreos nos canais excretores principais. A comparação morfométrica não pode ser realizada devido a inexistência de medidas para as larvas reportadas na África. A obtenção de sequências nucleotídicas ou dados experimentais desta larva são necessários para a possível associação entre Echinostomatidae gen. sp. 5 e representantes do gênero *Patagifer*.

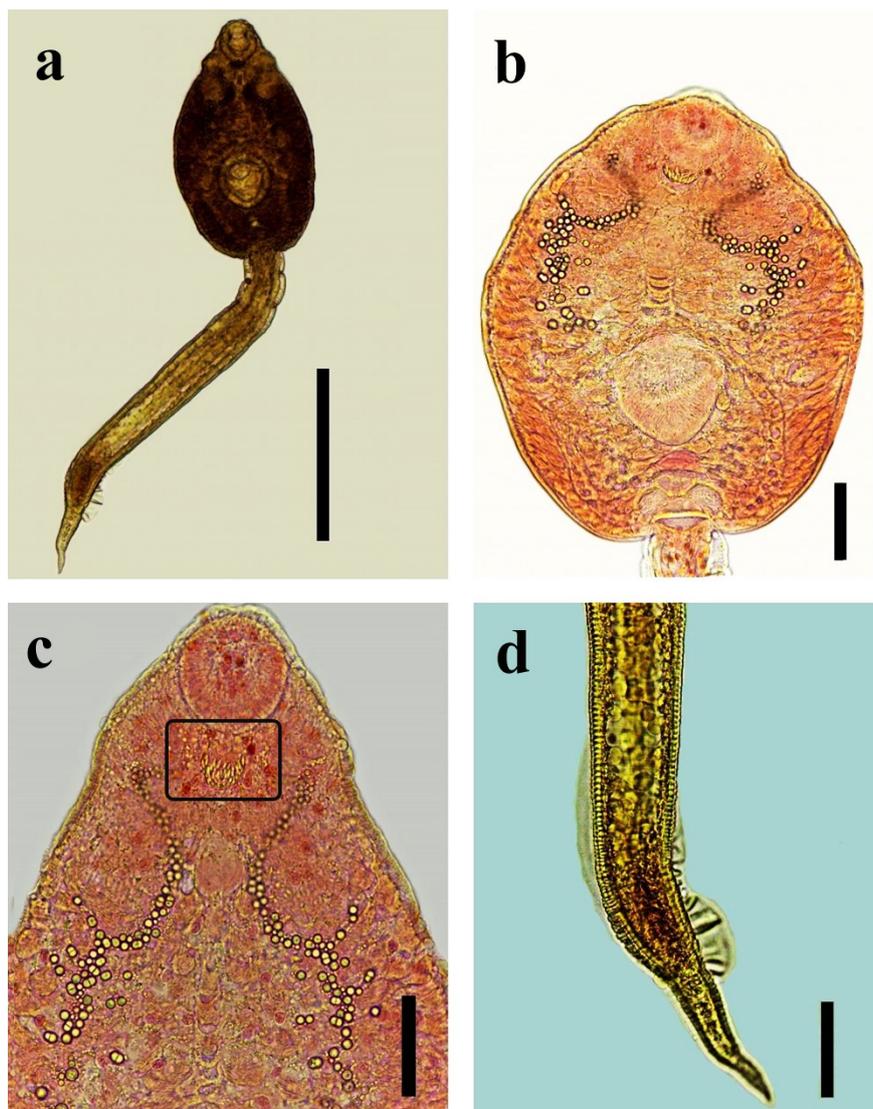


FIGURA 22- Echinostomatidae gen. sp. 5. (a) Cercária emergida de exemplar de *Biomphalaria* sp. coletado no estado de Rio de Janeiro. (b) Detalhe do corpo da cercária. (c) Detalhe do órgão prefaringeal com espinhos. (d) Detalhe da cauda com membrana natatória. Escalas: 200  $\mu$ m (a), 50  $\mu$ m (b, c, d).

TABELA 12- Dados morfométricos de cercárias de Echinostomatidae gen. sp. 5 encontradas em *Biomphalaria* sp. no Rio de Janeiro, RJ, Brasil, e dados de larvas semelhantes apresentadas por outros autores

<b>Espécie</b>		<b>Echinostomatidae gen. sp. 5</b>	<b>Echinostomatidae N° 3</b>	<b><i>Episthmium suspensum</i></b>	<b><i>Echinostoma hystricosum</i></b>	<b><i>Cercaria sudanensis</i></b>
<b>Localidade</b>		Brasil	Argentina	Argentina	Sudão	Malásia
<b>Hospedeiro</b>		<i>Biomphalaria</i> sp.	<i>B. tenagophila</i>	<i>B. peregrina</i>	<i>Radix rubiginosa</i>	<i>Bulinus cortortus</i>
<b>Referência</b>		Presente estudo	MARTORELLI <i>et al.</i> (2013)	OSTROWSKI DE NÚÑEZ (1974a)	LIE & UMATHEVY (1966)	ARCHIBALD & MARSHALL (1931)
<b>Corpo</b>	C	260 ± 26 (243-300)	231 ± 26 (200-264)	592-666	295-402	380-420
	L	144 ± 8 (129-157)	128 ± 27 (100-165)	-	141-201	188-232
<b>Cauda</b>	C	510 ± 17 (493-543)	412 ± 38 (360-450)	555-592	456-590	560
	L	47 ± 4 (36-50)	33 ± 4 (30-39)	-	45-54	48-60
<b>Ventosa oral</b>	C	39 ± 4 (35-46)	33 ± 2 (30-35)	52-65	36-42	48-60
	L	37 ± 3 (35-44)	33 ± 2 (30-35)	-	-	-
<b>Ventosa Ventral</b>	C	61 ± 7 (44-70)	47 ± 1 (45-48)	65-91	51-66	-
	L	62 ± 12 (53-111)	-	-	54-63	-

#### 5.1.2.9- *Rhopalias* spp. (Echinostomatoidea: Echinostomatidae)

Localidade: Belo Horizonte, Patos de Minas, Januária e Dores do Indaiá - Minas Gerais, Brasil.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria straminea*, *Biomphalaria glabrata*, *Gundlachia tigaca* e *Drepanotrema lucidum*.

##### 5.1.2.9.1- Caracterização morfológica

*Cercaria*: corpo oval, cauda simples, colar cefálico sem espinhos, ventosa oral subterminal, faringe muscular, cecos intestinais ausentes, ventosa ventral equatorial e glândulas cistogênicas dispostas lateralmente no corpo (Figura 23 a e b). Dois ou três concreções circulares grandes, medindo cerca de 22-28  $\mu\text{m}$  por 16-20  $\mu\text{m}$ , em cada um dos túbulos principais do sistema excretor (Figura 23 c). Primórdio genital compreende duas massas de células localizadas na região anterior e posterior da ventosa ventral. As medidas de cercárias obtidas para quatro das amostras aqui avaliadas são demonstradas na tabela 13, juntamente com medidas de larvas semelhantes relatadas por diferentes autores da América do Sul.

*Metacercária*: oval, com parede cística fina e transparente,  $186\pm 4$  (183-191) x  $153\pm 31$  (107-175). Cada ducto excretor principal com 2 a 3 grânulos grandes. Ventosa oral subterminal, oval  $39\pm 7$  (28-44) x  $51\pm 3$  (49-55). Ventosa ventral oval, maior que a ventosa oral,  $71\pm 4$  (67-75) x  $82\pm 6$  (76-88) (Figura 23 c).

As metacercárias foram encontradas em girinos no mesmo corpo d'água em que foram encontrados espécimes de *B. glabrata* infectados (Januária).

##### 5.1.2.9.2- Estudo molecular

No geral, os dados moleculares obtidos para regiões parciais dos genes nucleares 28S e ITS1-5.8S-ITS2 revelaram que estas cercárias aqui relatadas em moluscos planorbídeos pertencem ao gênero *Rhopalias*. O conjunto de dados 28S (alinhamento final 1086 pb) consistiu em 29 sequências, incluindo dados de três isolados norte-americanos de *Rhopalias* spp. previamente sequenciados (dois isolados de *R. macracanthus* e um isolado de *R. coronatus* do México). As análises filogenéticas (Figura

25) revelaram que as amostras de larvas de 4 localidades avaliadas formam um clado bem sustentado com estes isolados da América do Norte. Este clado apresenta *Ribeiroia ondatrae* (Price, 1932) e *Cathaemasia hians* (Rudolphi, 1809) como grupo irmão. Considerando as amostras de cercárias aqui avaliadas, as divergências genéticas no 28S foram de 0,2-1,3%. A divergência intergenérica em relação a *Ribeiroia* e *Cathaemasia* foram 4,1-4,9% e 2,7-3,1%, respectivamente (Anexo 2: Tabela 9).

Com relação ao ITS (Figura 26 a,b), sequências de 1117 pb (ITS1-5.8S-ITS-2) foram obtidas e comparadas com dados disponíveis para 3 espécies de *Rhopalias* com sequências disponíveis. A árvore filogenética também revelou um clado bem suportado formado contendo as amostras do Brasil e isolados norte-americanos de *R. macracanthus*, *R. oochi* e *R. coronatus*. Além disso, as mesmas sequências foram utilizadas em um outro alinhamento de 400 pb visando a comparação com isolados disponíveis no GenBank exclusivamente para a região ITS2. Os isolados brasileiros foram novamente semelhantes entre si neste marcador molecular [divergência de 0,1% (ITS1-5.8S-ITS2) e 0% (ITS2)]. Além disso, diferiram de *R. coronatus* em 0,6-4% (ITS1-5.8S-ITS2) e 0,8-1,8% (ITS2), de *R. macracanthus* por 7-8,3% (ITS1-5.8S-ITS2) e 5,5-7,4% (ITS2) e de *R. oochi* em 0,6-4% (ITS1-5.8S-ITS2) e 0,8-1,8% (ITS2). As diferenças intergenéricas em relação a *Ribeiroia* e *Cathaemasia*, foram 6,9-8,8% e 5,3-6,9%, respectivamente (Anexo 2: Tabelas 10 e 11).

Os dados moleculares de *Nad-1* (Figura 27), compostos por 397 pb, revelaram que três espécies são encontradas entre as 6 amostras avaliadas no presente estudo. Nenhuma diferença molecular foi verificada entre as sequências obtidas de larvas oriundas de *Biomphalaria straminea* e *Gundlachia ticaga*, encontradas naturalmente infectadas em dois lagos urbanos de Belo Horizonte, revelando tratar-se da mesma espécie, aqui denominada como *Rhopalias* sp. 1. As cercárias encontradas em *D. lucidum* de Patos de Minas e em *B. glabrata* de Januária também pertencem à mesma espécie aqui denominada *Rhopalias* sp. 2 (diferença molecular de 1,8-2,4%). Esta difere de *Rhopalias* sp. 1 em 7,7-8,4%. Larvas encontradas em *D. lucidum* de Dores do Indaiá difere 9,8-9,9% dos isolados de *Rhopalias* sp. 1 e *Rhopalias* sp. 2, revelando tratar-se de uma espécie distinta aqui denominada como *Rhopalias* sp. 3. Estas são as primeiras sequências moleculares *Nad-1* obtidas para espécies do gênero *Rhopalias*. Considerando outras espécies de Echinostomatoidea, as espécies mais próximas com as sequências disponíveis são *Drepanocephalus* spp. (divergência molecular 23,4-30,3%) e *Petasiger* spp. (divergência nucleotídica 26,1-32%) (Anexo 2: Tabela 12).

Tentativas de obtenção de sequências *Cox-1* (Figura 28) foram realizadas para isolados das três espécies de *Rhopalias* deste estudo. No entanto, as sequências foram obtidas apenas para *Rhopalias* sp. 1 e *Rhopalias* sp. 2 (denominação realizada com base nas sequências *Nad-1*). Os contigs (612 e 675 pb) foram alinhados com os dados disponíveis para isolados de três espécies sequenciadas no México e EUA em um alinhamento final de 612 pb. Os resultados obtidos revelaram que as duas espécies sequenciadas para este marcador no presente estudo, *Rhopalias* sp. 1 e *Rhopalias* sp. 2 diferem 9,2-9,7% de *R. coronatus*; 15,1-16,5% de *R. macracanthus* e 9,0-10,1% de *R. oochi*, o que indica que são espécies distintas. Considerando outros gêneros de equinostomatídeos, *Rhopalias* spp. do Brasil diferem de espécies dos gêneros *Drepanocephalus* (21,8-25,5%), *Echinoparyphium* (22,3%-23,2%), *Echinostoma* (21,8-23%) e *Hypoderaeum* (24,0%-25,1%) (Anexo 2: Tabela 13).

#### 5.1.2.9.3- Comentários taxonômicos

As cercárias de *Rhopalias* spp. aqui identificadas são morfologicamente similares a uma larva originalmente descrita como *Cercaria macrogranulosa*, encontrada em *B. glabrata* coletadas em Belo Horizonte (RUIZ, 1953), localidade onde a espécie identificada como *Rhopalias* sp. 1 foi encontrada). Desde então, essas cercárias foram relatadas em algumas espécies de planorbídeos do gênero *Biomphalaria* e *Drepanotrema* no Brasil (revisado por PINTO & MELO, 2013b) e na Argentina (OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.*, 1990). Duas outras larvas, identificadas como *Cercaria echinostoma* 2 e *Cercaria guaibensis* 8 (VEITENHEIMER-MENDES, 1982; VEITENHEIMER-MENDES *et al.*, 1995), também apresentam morfologia geral semelhante às larvas aqui relatadas. A análise morfológica de 6 amostras, revelou que as cercárias são semelhantes e nenhuma diferença morfológica ou morfométrica evidente foi encontrada entre as cercárias. Em geral, a principal característica comum nas três espécies de *Rhopalias* aqui estudadas é a presença de poucas concreções circulares grandes no túbulo principal do sistema excretor, uma característica que as separa de outras larvas de equinostomatídeos conhecidas.



FIGURA 23- *Rhopalias* sp. 1. (a) Cercária emergida de *B. glabrata* (b) Detalhe do corpo da larva emergida de *G. ticaga*. (c) Concreções circulares características de larvas deste gênero. (d) Metacercárias encontradas encistadas em girinos em uma das localidades de estudo. Escalas: 200  $\mu\text{m}$  (a). 50  $\mu\text{m}$  (b, c).

TABELA 13- Dados morfométricos de cercárias de *Rhopalias* spp. encontradas em *Biomphalaria straminea*, *Biomphalaria glabrata*, *Gundlachia tigaca* e *Drepanotrema lucidum*, em Belo Horizonte, Patos de Minas, Januária e Dores do Indaiá - Minas Gerais, Brasil e medidas de larvas semelhantes apresentadas por outros autores

Espécie		<i>Rhopalias</i> sp. 1	<i>Rhopalias</i> sp. 2	<i>Rhopalias</i> sp. 2	<i>Rhopalias</i> sp. 3	<i>Cercaria macrogranulosa</i>		<i>Cercaria echinostoma</i> 2	<i>Cercaria guuibensis</i> 8
Localidade		Brasil -Belo Horizonte	Brasil -Patos de Minas	Brasil-Januária	Brasil-Dores do Indaiá	Brasil	Argentina	Brasil	Brasil
Hospedeiro		<i>Biomphalaria straminea</i>	<i>Drepanotrema lucidum</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>Drepanotrema lucidum</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	<i>Drepanotrema depressissimum</i>	<i>Biomphalaria peregrina</i>	<i>Drepanotrema depressissimum</i>
Referência		Presente estudo	Presente estudo	Presente estudo	Presente estudo	RUIZ (1953)	OSTROWSKI DE NUÑEZ <i>et al.</i> (1990)	VEITENHEIMER-MENDES (1982)	VEITENHEIMER-MENDES (1995)
<b>Corpo</b>	C	248 ± 12 (232-280)	220 ± 30 (149-269)	217 ± 15 (177-248)	211 ± 14 (186-229)	215-283	242 ± 11 (218-260)	222-249	360
	L	132 ± 8 (123-157)	118 ± 27 (78-199)	133 ± 8 (149-121)	124 ± 14 (107-150)	91	96 ± 8 (210-252)	111-127	-
<b>Cauda</b>	C	449 ± 14(423-478)	438 ± 24 (383-468)	411±15 (355-432)	368±18(350-400)	340-493	436 ± 19 (420-470)	360-407	420
	L	52 ± 4 (47-62)	41 ± 6 (36-57)	39 ± 4 (43-28)	50 ± 8 (36-57)	-	46 ± 4 (42-50)	37-55	-
<b>Ventosa oral</b>	C	43 ± 1 (42-45)	38 ± 3 (32-45)	42 ± 3 (45-36)	45 ± 4 (39-53)	40-47	38 ± 3 (31-42)	34-41	45
	L	43 ± 1 (42-45)	37 ± 3 (32-53)	42 ± 3 (46-36)	48 ± 4 (44-53)	-	39 ± 3 (31-42)	-	-
<b>Ventosa ventral</b>	C	50 ± 3 (45-57)	47 ± 6 (32-59)	46 ± 5 (63-36)	54 ± 11 (35-69)	54-70	57 ± 5 (48-63)	48-67	55
	L	56 ± 3 (52-58)	55 ± 7 (35-72)	63 ± 4 (71-54)	58 ± 7 (51-70)	-	60 ± 5 (52-69)	-	-
<b>Faringe</b>	C	21 ± 2 (18-25)	18 ± 4 (14-21)	25 ± 5 (36-18)	21 ± 7 (12-26)	-	20 ± 7 (21-25)	-	-
	L	17 ± 1 (15-18)	15 ± 2 (13-18)	17 ± 6 (36-11)	20 ± 7 (12-23)	-	18 ± 3 (10-23)	-	-

#### 5.1.2.10- *Ribeiroia* sp. (Echinostomatoidea: Echinostomatidae)

Localidade: Belo Horizonte, Frutal - Minas Gerais e Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria glabrata*

##### 5.1.2.10.1- Caracterização morfológica

As amostras destas larvas (Figura 24) foram usadas exclusivamente para a análise molecular. A avaliação morfológica foi previamente realizada por PINTO *et al.* (2013b), sendo a espécie identificada a partir de estudos experimentais e moleculares.

##### 5.1.2.10.2- Estudo molecular

A análise da sequência 28S obtida para *Ribeiroia* sp. (977 pb) constou de uma sequência obtida para a localidade de Belo Horizonte e foi usada para a construção de um alinhamento final de 1086 pb. *Ribeiroia* sp. agrupou num mesmo clado (bem suportado) com os isolados da Quênia e Estados Unidos (Figura 25), sendo verificada divergências nucleotídicas de 0,2-0,9%. A comparação com outros gêneros de Echinostomatidae com sequências disponíveis revelou diferenças maiores [*Cathaemasia* (3,9%), *Chaunocephalus* (5,7%), *Drepanocephalus* (6,6-6,7%), *Echinostoma* (7,5-8%), *Isthmiophora* (5,8-6%), *Neopetasiger* (6,2-6,3%) e *Petasiger* (6,3- 6,6%)] (Anexo 2: Tabela 9).

Na análise com o marcador nuclear ITS1-5.8S-ITS2 (Figura 26 a, b), obteve-se dados para três isolados Rio de Janeiro (1015 pb), Frutal (1016 pb) e Belo Horizonte (1023 pb). Nas análises filogenéticas, foram gerados alinhamentos contendo a região ITS1-5.8S-ITS2 (1117 pb) ou apenas o ITS2 (400 pb), uma vez que para o gênero de interesse, só existiam para comparação dados desta última região. Não foram observadas divergências entre os isolados de *Ribeiroia* sp. do presente estudo. Com a análise da região ITS2, os isolados analisados neste estudo formaram um clado com um bom suporte *Ribeiroia* sp. da Argentina (KF525784), *Ribeiroia marini* de Porto Rico (AY761147) e *Ribeiroia ondatrae* dos Estados Unidos (AY761142) (DAVIES *et al.*, 2015; WILSON *et al.*, 2005), com divergências de 0%, 0,5% e 1,1% respectivamente. Com relação a outras sequências de Echinostomatidae as diferenças nucleotídicas foram maiores (9,1% para

*Cathaemasia hians*; 14,7-16,8% para *Echinostoma* spp. e 7,2-9,8% para *Rhopalias* spp.) (Anexo 2: Tabelas 10 e 11).

Não foram obtidas sequências de qualidade do marcador mitocondrial *Nad-1* para nenhum dos isolados de *Ribeiroia* do presente estudo. Recentemente, foram disponibilizadas sequências *Cox-1* para isolados norte-americanos de *R. ondatrae* (JOHNSON *et al.*, 2020). A obtenção da mesma região foi realizada para o isolado de *Ribeiroia* sp. encontrado em *B. glabrata* de Belo Horizonte (912 pb). Nas análises filogenéticas foi observado que a espécie do Brasil se apresentou em um clado distinto dos isolados de *R. ondatrae* da América do Norte (Figura 29) diferindo em 12,3-12,5% (Anexo 2: Tabela 14), o que indica tratar-se de espécies distintas.

#### 5.1.2.10.3- Comentários taxonômicos

As cercárias obtidas no presente estudo apresentaram similaridade morfológica com as larvas descritas para o gênero *Ribeiroia*. Apesar de existirem vários relatos sobre o encontro de parasitos adultos em aves (TRAVASSOS, 1939; DUBOIS e MAHON, 1959; JOHNSON *et al.*, 2004), relatos da infecção dos primeiros hospedeiros intermediários são escassos. Larvas com morfologia compatível com *Ribeiroia* (apresentando divertículo esofágico) foram encontradas em *Biomphalaria prona* Martens, 1873, *Biomphalaria kuhniiana* (Clessin, 1883) e *Marisa cornuarietis* (Linnaeus, 1758) na Venezuela (NASIR *et al.*, 1969; NASIR e DÍAZ, 1973; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1981a) e em *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981 na Argentina (OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.*, 1991). Mais recentemente, PINTO *et al.* (2013b) identificaram por abordagem experimental e molecular (ITS1) larvas de *Ribeiroia* sp. em *B. straminea* em uma das localidades do presente estudo. Na Argentina, dados moleculares (ITS2) também permitiram a identificação de *Ribeiroia* sp. em *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria orbigny* (DAVIES *et al.*, 2015).

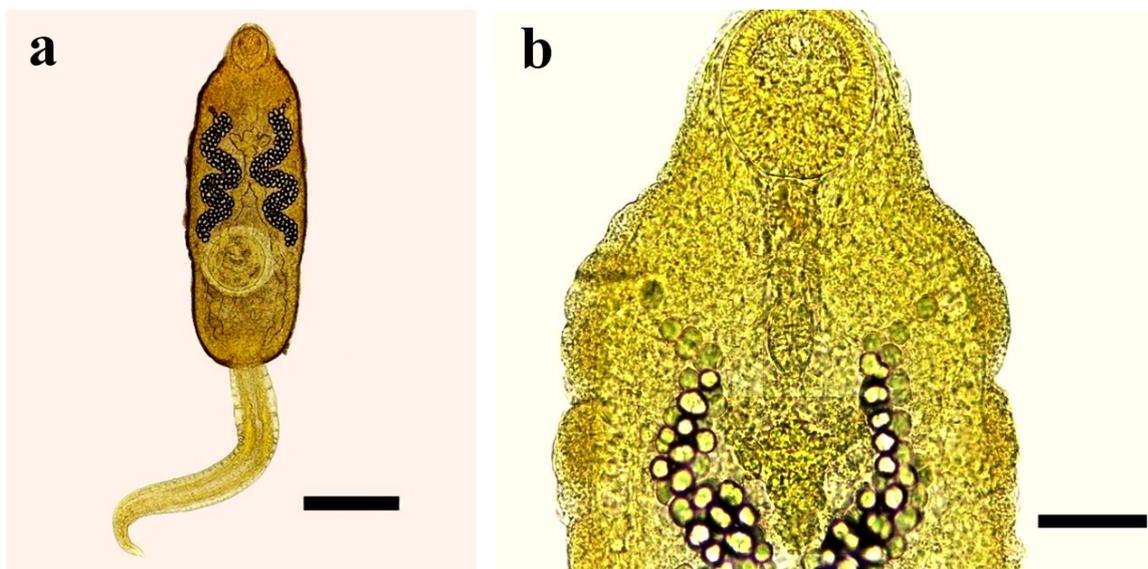


FIGURA 24- *Ribeiroia* sp. (a) Cercária emergida naturalmente de *Biomphalaria straminea*. (b) Detalhe do corpo cercariano em que se observa a presença de divertículos esofagianos. Escalas: 200  $\mu\text{m}$  (a). 50  $\mu\text{m}$  (b).

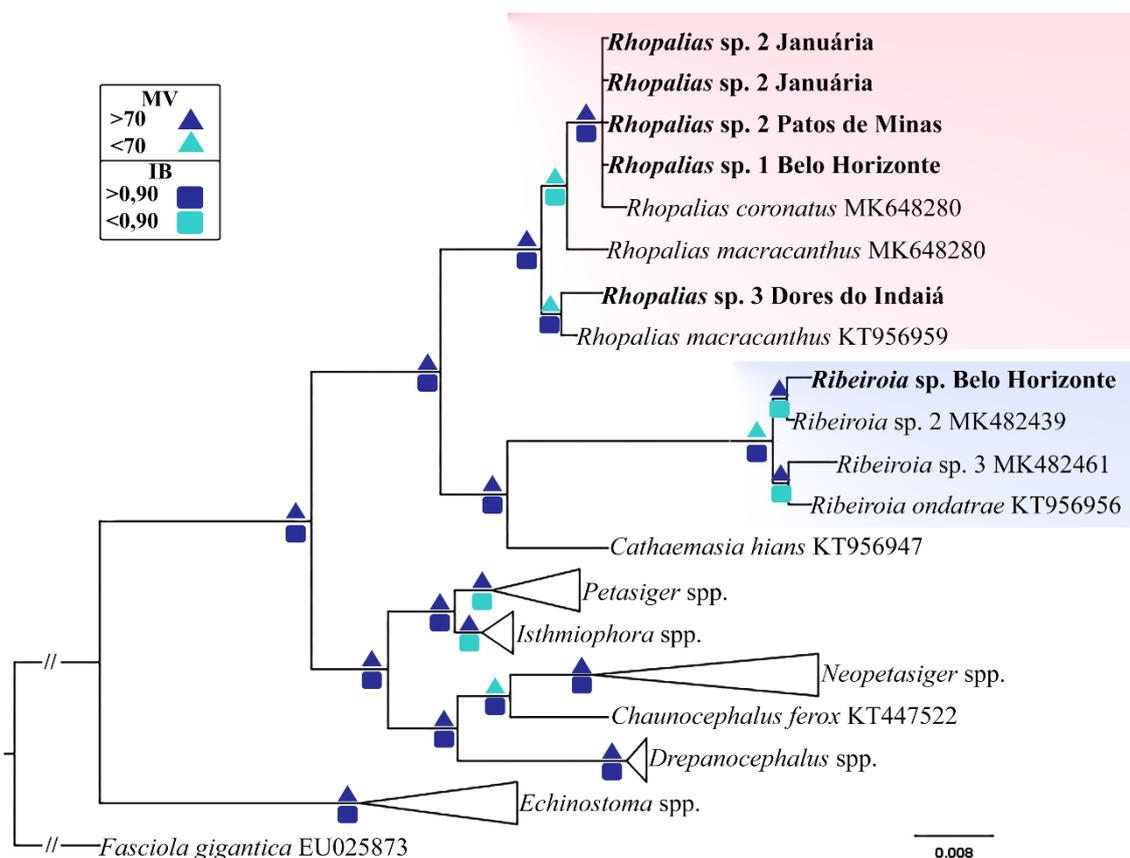


FIGURA 25- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene 28S de cercárias identificadas como *Rhopalias* spp. e *Ribeiroia* sp. (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo GTR+G+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Fasciola gigantica* foi usado como grupo externo.

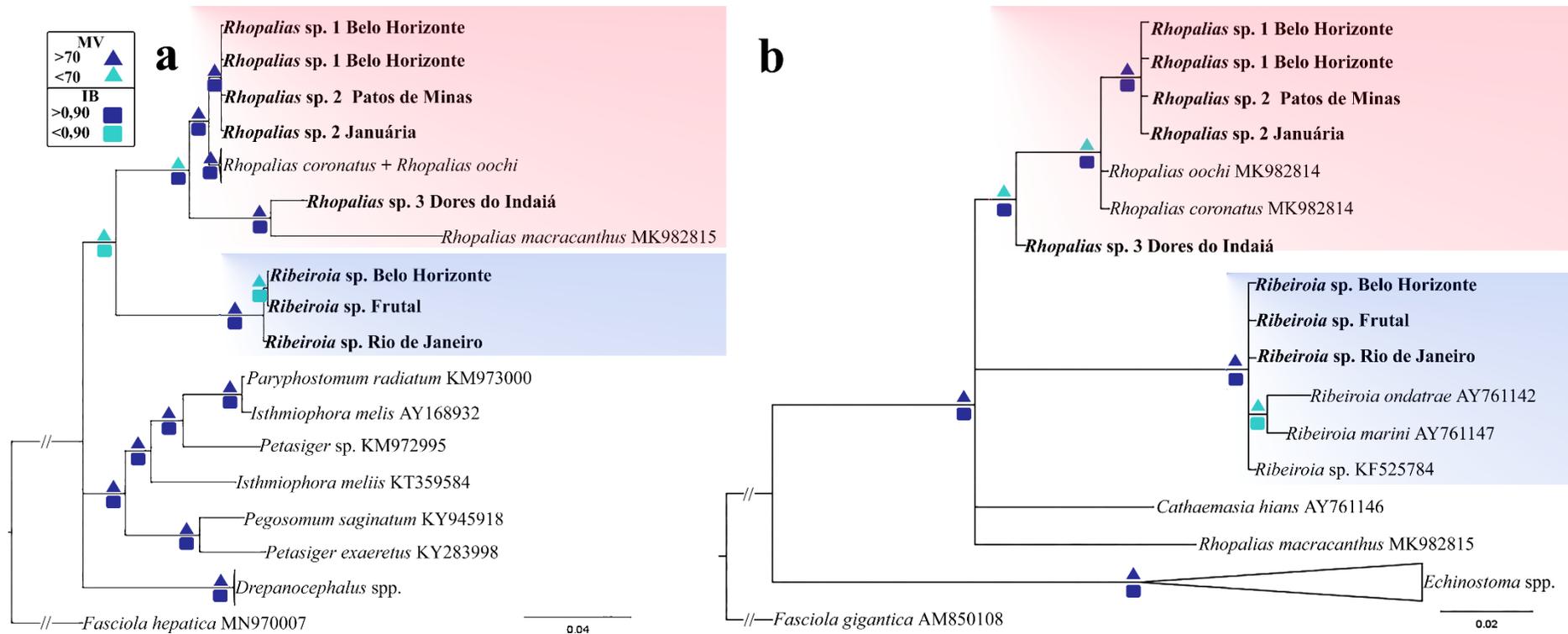


FIGURA 26- Relação filogenética baseada na análise de seqüências parciais da região transcrita espaçadora interna: (a) ITS1-5.8S-ITS2 e (b) ITS2 de cercárias identificadas como *Rhopalias* spp. e *Ribeiroia* sp. (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com seqüências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo K2+G (a,b). O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (□) e bootstrap (△), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Fasciola hepatica* (a) e *Fasciola gigantica* (b) foram usados como grupos externos.

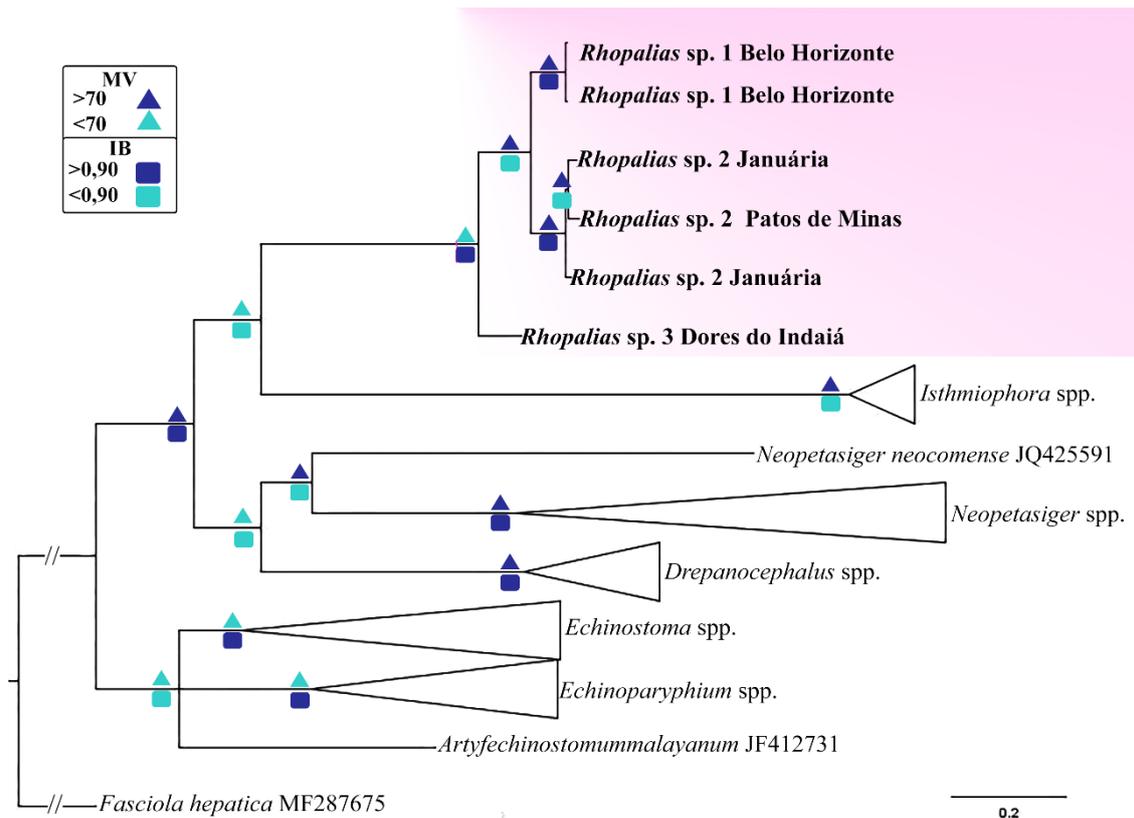


FIGURA 27- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene mitocondrial *Nad-1* de cercárias identificadas como *Rhopalias* spp. (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo GTR+G+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Fasciola hepatica* foi usado como grupo externo.

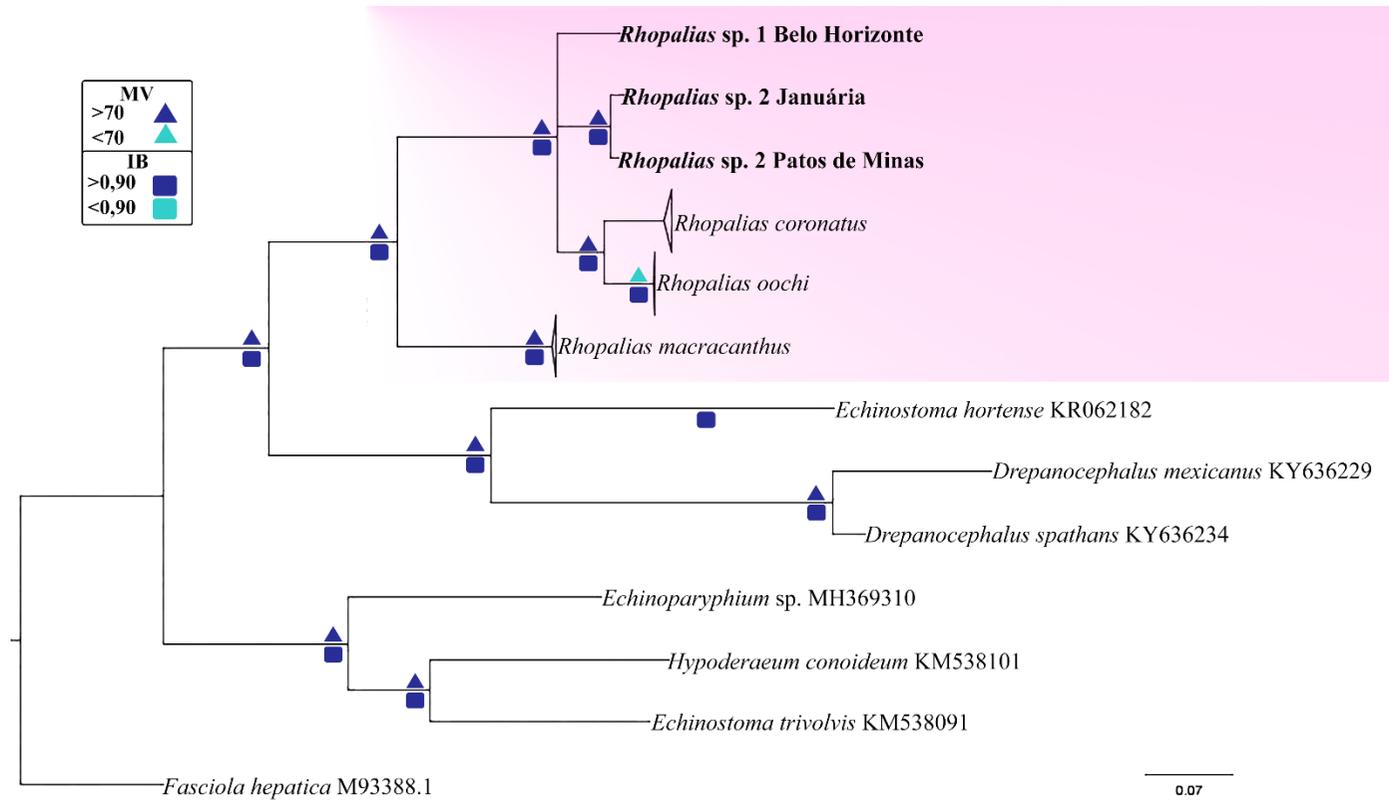


FIGURA 28- Relação filogenética baseada na análise de seqüências parciais do gene citocromo c oxidase subunidade I *Cox-I* (região barcode) de cercárias identificadas como *Rhopalias* spp. (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com seqüências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+G+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Fasciola hepatica* foi usado como grupo externo.

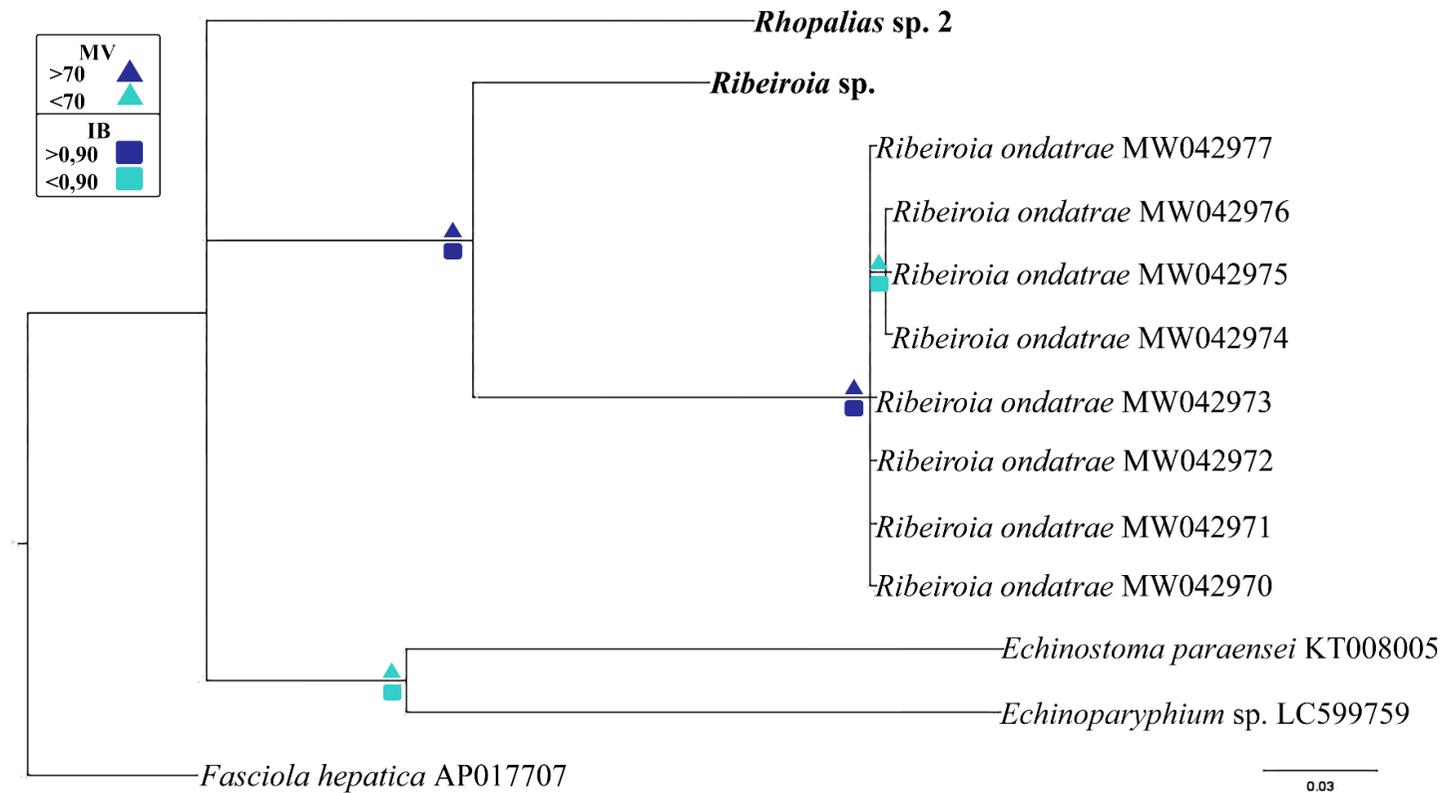


FIGURA 29- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene citocromo c oxidase subunidade I *Cox-I* (Região pós-barcode) de cercárias identificadas como *Ribeiroia* sp. (em negrito) e outras espécies de Echinostomatoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (□) e bootstrap (△), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Fasciola hepatica* foi usado como grupo externo.

### 5.1.3- Discussão

No presente estudo, a superfamília Echinostomatoidea encontrou-se representada por larvas de 10 espécies de trematódeos preliminarmente caracterizadas como cercárias dos tipos equinóstoma e gimnocéfala. Estes tipos cercarianos estiveram presentes em amostras de moluscos previamente coletados em localidades dos estados do Maranhão, Minas Gerais e Rio de Janeiro. A única larva do tipo gimnocéfala foi encontrada em *Pomacea maculata* oriundas do estado do Maranhão e identificada, através das análises filogenéticas, como Echinochasmidae gen. sp.

As últimas revisões sobre a filogenia de trematódeos têm levado a alterações no *status* de certas famílias e subfamílias. Este é o caso da subfamília Echinochasminae, elevada a nível de família após a revisão mais recente da superfamília Echinostomatoidea (TKACH *et al.*, 2016). Esta família, recentemente estabelecida, é composta por trematódeos parasitos de aves, mamíferos e répteis, apresentando uma ampla distribuição mundial (KONSTANDINOVA, 2005). No Brasil, aproximadamente 14 espécies pertencentes a quatro gêneros (*Echinochasmus Microparyphium*, *Stephanoprora* e *Uroproctepisthmium*) já foram reportadas em aves, mamíferos e répteis (revisado por FERNANDES & KONH, 2014; FERNANDES *et al.*, 2015). Alguns parasitos desta família, especialmente algumas espécies do gênero *Echinochasmus* já foram relatados causando doenças em humanos na Ásia (CHOI *et al.*, 2006; TOLEDO & ESTEBAN, 2016).

Do ponto de vista morfológico, Echinochasmidae gen. sp. foi similar a uma larva do tipo gimnocéfala identificada como *Guaicaipuria parapseudoconcilia* Nasir & Silva, 1972 na Venezuela, onde foi também encontrada em moluscos ampularídeos do gênero *Pomacea*. O gênero *Guaicaipuria* foi proposto por Nasir *et al.* (1971), sendo originalmente incluído na família Cathaemasiidae Fuhrmann, 1928, e subfamília Guaicaipuriinae Nasir *et al.* (1971). O gênero contém, além de *G. parapseudoconcilia*, apenas a espécie tipo, *Guaicaipuria pseudoconcilia* (Nasir, Diaz & Lemus de Guevara, 1969). As cercárias destas espécies encistam-se nas brânquias de peixes de água doce. Um fato interessante é que os adultos dessas duas espécies são indistinguíveis morfológicamente, mas há diferenças substanciais nas cercárias. A ausência de sistema digestivo posterior à faringe em *G. parapseudoconcilia* é a diferença mais marcante. Apesar de novos estudos serem necessários para associar a larva aqui caracterizada com espécies do gênero *Guaicaipuria*, os dados obtidos são importantes, pois apontam que

este gênero muito provavelmente pertence à família Echinochasmidae e não a Cathaemasidae, como previamente considerado nas classificações morfológicas (KOSTADINOVA, 2005).

As análises filogenéticas baseada nos três marcadores utilizados neste estudo revelaram árvores filogenéticas com topologia geral semelhantes às apresentadas por diferentes autores na América do Norte e Europa (TKACH *et al.*, 2016; BESPROZVANNYKH *et al.*, 2017; TATONOVA *et al.*, 2020), revelando dois clados dentro da família Echinochasmidae. A cercária aqui registrada pela primeira vez no Brasil agrupou-se dentro do clado contendo a espécie tipo do gênero *E. coaxatus*, porém, mais próxima ao subclado no qual estão inseridos os isolados da Argentina, identificados como Echinochasmidae sp. O outro grande clado recuperado esteve representado por *Stephanoprora* spp., *Echinochasmus milvi* e *E. suiifinensis*.

Assim como reportado por TKACH *et al.* (2016), o gênero *Echinochasmus* se demonstrou parafilético nas novas análises realizadas para este estudo. Além disso, TATONOVA *et al.* (2020) relataram semelhança morfológica entre o número de espinhos e o comprimento da cauda em cercárias das espécies do segundo agrupamento, obtidas tanto com 28S como ITS2, o que é reforçado pelos resultados obtidos por TKACH *et al.* (2016) quem demonstraram que todos os membros do clado contendo a espécie-tipo de *Echinochasmus* (*E. coaxatus*) possuem 24 espinhos no colar e cauda curta, enquanto que os membros do clado *Stephanoprora* + *Echinochasmus* possuem 20 e 22 espinhos no colar e cauda longa. Porém, esta característica não foi confirmada para todas as espécies em ambos os clados devido à ausência de informações da história de vida para a maioria dos parasitos deste grupo (BESPROZVANNYKH *et al.*, 2017; TATONOVA *et al.*, 2020). TKACH *et al.* (2016) determinaram que o clado contendo *E. coaxatus* (espécie-tipo) representa *Echinochasmus* e que o segundo clado representa *Stephanoprora*. Fatos que em certa forma foram evidenciados neste estudo, mostrando basicamente dois padrões relacionados ao formato da cauda (leptocerca ou magnacauda). As espécies com cercárias do tipo leptocerca, ou seja, apresentando cauda delgada e mais estreita que o corpo, agruparam-se em um mesmo clado bem suportado formado por *Echinochasmus coaxatus*, *E. beleocephalus*, *E. japonicus*, *Uroproctepisthmium bursicola*, *Microparyphium facetum*, Echinochasmidae sp. e *Echinostomatidae* sp. Por outro lado, espécies com cercárias do tipo magnacauda agruparam-se em um clado formado por *Stephanoprora pseudoechinata*, *S. chasanensis*, *S. amurensis*, *S. uruguayense*, *Stephanoprora* sp. 1, *Stephanoprora* sp. 2, *Echinochasmus milvi*, *E. mordax*, *E.*

*donaldsoni*, *E. suifunensis*, *Echinochasmus* sp. e *Echinochasmus* sp. 1. Em relação às sequências da Argentina, é provável que o isolado do presente estudo pertença ao mesmo gênero, mas a espécies distintas (DELLAGNOLA *et al.*, 2019).

As demais larvas pertencentes a superfamília Echinostomatoidea avaliadas neste estudo possuem cercárias apresentando colar cefálico (com ou sem espinhos), sendo por isso classificadas como larvas do tipo equinóstoma. Estas cercárias emergiram de moluscos planorbídeos de diferentes localidades de três estados brasileiras. Entre elas, foi possível identificar *Drepanocephalus spathans*, encontrada em *B. straminea* e *B. occidentalis* de coleções aquáticas de Belo Horizonte, Betim e Contagem.

O gênero *Drepanocephalus* Dietz, 1909 compreende parasitos de aves piscívoras das famílias Phalacrocoracidae e Sulidae distribuídas nas Américas. Nos últimos anos, uma história taxonômica complexa foi verificada neste gênero, incluindo a análise de algumas espécies de *Drepanocephalus* previamente incluídas em *Petasiger* e *Paryphostomum* (KOSTADINOVA *et al.*, 2002; e TKACH *et al.*, 2016). Atualmente, três espécies deste gênero são consideradas válidas: *D. olivaceus* Nasir & Marval, 1968, *D. mexicanus*. e *D. spathans* (espécie-tipo). O ciclo biológico dos parasitos deste gênero envolve moluscos planorbídeos como primeiros hospedeiros intermediários, peixes como segundos e aves piscívoras como hospedeiros definitivos (GRIFFIN *et al.*, 2012; PINTO *et al.*, 2016; ALBERSON *et al.*, 2022). No Brasil, além de registros de *D. spathans* em aves naturalmente infectadas (FERNANDES *et al.*, 2015), existe o relato da participação de *Biomphalaria* spp. na transmissão de duas espécies identificadas originalmente como *D. spathans* e *Drepanocephalus* sp. foram verificadas na Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte (PINTO *et al.*, 2016). Segundo HERNÁNDEZ-CRUZ *et al.* (2017), o isolado brasileiro de *Drepanocephalus* sp. corresponde a *D. mexicanus*, espécie ainda não reportada em aves no Brasil.

As larvas aqui encontradas em *B. straminea* e *B. occidentalis* foram identificadas como *D. spathans* por apresentarem similaridade morfológica e baixa divergência molecular no que se refere ao marcador mitocondrial *Nad-1*. Esta espécie possui uma ampla distribuição no continente americano, com relatos em aves no Argentina, Brasil, Canadá, Colômbia, EUA Paraguai e Venezuela (CABALLERO & DÍAZ UNGRIA, 1958; KOSTADINOVA *et al.*, 2002; FLOWERS *et al.*, 2004; DRAGO *et al.*, 2011; WAGNER *et al.*, 2012; O'HEAR *et al.*, 2014). Por outro lado, os registros envolvendo os moluscos transmissores deste parasito são relativamente escassos, sendo *B. occidentalis* aqui relatado como primeiro hospedeiro intermediário de *D. spathans*.

Larvas do tipo magnacauda com 19 espinhos no colar cefálico foram identificadas através de uma análise morfológica e molecular como pertencentes ao gênero *Neopetasiger* Bashkirova, 1941. As espécies deste gênero são parasitos de aves, predominantemente da família Podicipididae, mas, com relatos ocasionais em aves das famílias Anatidae, Anhingidae, Laridae, Phalacrocoracidae e Phoenicopteridae (TKACH *et al.*, 2016). A história taxonômica deste gênero é bastante controversa. *Neopetasiger* foi originalmente estabelecido como subgênero de *Petasiger* e incluía espécies com 19 espinhos no colar cefálico e testículos oblíquos ou simétricos, diferentemente do subgênero *Petasiger* que apresentava espécies com testículos em tandem (BASHKIROVA, 1941; FALTÝNKOVÁ *et al.*, 2008). Outros autores consideraram que a posição dos testículos era um caráter variável que não deveria ser usado para a diferenciação dos dois subgêneros, sendo o uso desta categoria taxonômica não considerado por alguns autores (YAMAGUTI, 1971; KOSTADINOVA, 2005; FALTÝNKOVÁ *et al.*, 2008) Mais recentemente, TKACH *et al.* (2016), através de análises moleculares concluíram ser mais parcimonioso elevar *Neopetasiger* ao nível de gênero para incluir exemplares com 19 espinhos no colar cefálico.

No que se refere aos estágios larvais, cercárias do gênero *Neopetasiger* possuem como característica diferencial dentro da família, a presença de uma cauda cerca de 5 vezes maior do que o corpo. Algumas outras espécies de Echinostomatoidea possuem larvas com morfológica similar (p. ex. *Stephanoprora* spp.), porém, a diferença encontra-se no tamanho do corpo e cauda (menores para espécies de *Neopetasiger*) e no número de espinhos no colar cefálico (TKACH *et al.*, 2016). Outras diferenças estão relacionadas ao tipo de molusco que atuam como primeiro hospedeiro intermediário. No caso de larvas de espécies do gênero *Stephanoprora* (Echinochasmidae), são moluscos caenogastropodes, enquanto em *Neopetasiger* moluscos pulmonados (TKACH *et al.*, 2016).

Na análise realizada com o marcador 28S no presente estudo, foi possível observar o agrupamento do parasito encontrado em duas localidades em um clado formado por espécies de *Neopetasiger*, dos Estados Unidos (identificadas como *Neopetasiger* sp.) e Canadá (identificadas como *Petasiger* sp. 4). Já nas análises com o marcador mitocondrial *Nad-1*, a topologia da árvore mostrou que os três isolados do presente estudo agruparam num subclado próximo às sequências de *Neopetasiger* sp. 4, *Petasiger* sp. e *Petasiger* sp. 4 do Canadá. Segundo os autores, todas estas larvas apresentavam a cauda longa, maior que o corpo, além de colar cefálico com 19 espinhos. Na análise de divergências

nucleotídicas os isolados brasileiros divergiram das sequências do Canadá em 4-4,8%, o que gerou dúvida, em um primeiro momento, se estes isolados pertenciam a uma mesma espécie. As análises envolvendo abordagens de delimitação de espécies baseada em distâncias moleculares (ASAP) revelaram que se trata de uma mesma espécie com ampla distribuição nas Américas.

Cercárias de cinco espécies pertencentes à família Echinostomatidae foram avaliadas neste estudo. Estas larvas foram encontradas em moluscos dos gêneros *Biomphalaria* e *Pomacea* em coleções aquáticas dos estados de Maranhão, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Em alguns casos, foram realizadas tentativas de infecção experimental para a obtenção de espécimes adultos, porém, sem sucesso. Apesar do estudo morfológico e molecular realizado, foi possível identificá-las apenas em nível de família.

A larva aqui identificada como Echinostomatidae gen. sp. 1 possui similaridade morfológica com *Cercaria granulifera* descrita inicialmente por LUTZ (1924). Estas larvas, encontradas em *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, foram associadas através de estudos experimentais a *Paryphostomum segregatum*, atualmente *Petasiger segregatum*, de acordo com a nova classificação proposta por TKACH *et al.* (2016). Uma característica morfológica considerada diferencial destas larvas é a presença de grânulos refringentes na base da ventosa oral. Posteriormente, larvas morfológicamente semelhantes foram encontradas em *Biomphalaria* spp. no Brasil (RUIZ, 1952a; JOE & BASCH, 1967) e Argentina (OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.*, 1990; 1991 e FERNANDEZ *et al.*, 2014).

O gênero *Paryphostomum* compreende parasitos com 27 espinhos no colar cefálico encontrados no intestino de aves das famílias Phalacrocoracidae, Ciconiidae e Sulidae (KOSTADINOVA, 2005). Mais recentemente, estudos moleculares resultaram na sinonímia entre o gênero *Paryphostomum* e *Petasiger* (TKACH *et al.*, 2016). Nas análises moleculares realizadas no presente estudo, principalmente a partir do uso do marcador 28S, foi observado que os isolados brasileiros não agruparam com espécies do gênero *Petasiger* disponíveis para comparação, incluindo *Petasiger radiatus* (antiga espécie tipo do gênero *Paryphostomum*) e *P. exaeretus* (espécie tipo do gênero *Petasiger*). As elevadas divergências genéticas entre as cercárias deste estudo e *Petasiger* spp. disponíveis para comparação, associadas à topologia das árvores filogenéticas, sugerem tratar-se de gêneros distintos. Adicionalmente, considerando outras larvas com 27 espinhos no colar cefálico registradas no Brasil, foram verificadas altas divergências em relação a *Drepanocephalus* spp.

Entre outros equinostomatídeos com ciclo biológico conhecido, a única espécie registrada apresentando cercárias com grânulos refringentes na base da ventosa oral é *Petasiger variospinosus*. As medidas do corpo e da cauda desta espécie descrita da África são maiores às de Echinostomatidae gen. sp. 1 do presente estudo. Do ponto de vista molecular, a comparação com uma sequência ITS2 disponível de *P. variospinosus* revelaram que os isolados deste estudo se agruparam em um clado diferente e apresentaram divergências moleculares significativas. Este resultado sugere que a presença de grânulos refringentes na base da ventosa oral não é exclusiva das cercárias do gênero *Petasiger*. Provavelmente, as larvas com essa morfologia encontrada no Brasil, e possivelmente os parasitos adultos previamente identificados como *P. segregatum* por diferentes autores, correspondam a um gênero novo de Echinostomatidae.

Uma outra larva, encontrada em *Pomacea* sp. na cidade de Januária, norte de Minas Gerais, foi identificada como Echinostomatidae gen. sp. 2. Apresenta como principal característica morfológica diferencial a presença de um colar cefálico com 31 espinhos. Dentro da família Echinostomatidae, apenas o gênero *Echinostoma* possui representantes com essa característica, sendo 4 espécies descritas em aves e mamíferos: *Echinostoma anseris* Yamaguti, 1939 na Ásia; *Echinostoma sudanense* Odhner, 1911 na África [(considerada por BEAVER (1937) como *species inquirenda*)]; *Echinostoma donosoi* Nasir, 1964 na Venezuela e *Echinostoma parcespinosum* Lutz, 1924 na Argentina, Brasil e Venezuela (YAMAGUTI, 1971; KANEV *et al.*, 2009; FERNANDEZ *et al.*, 2015). As cercárias aqui estudadas possuem similaridade morfológica e biológica com *E. parcespinosum*, estando as medidas de acordo com as descritas para larvas encontradas em *Pomacea* spp. por LUTZ (1924) no Brasil e por MARTORELLI (1987) na Argentina. A cercária encontrada também assemelha-se às larvas de *E. donosoi* reportadas na Venezuela (NASIR, 1964). Os dados moleculares obtidos não revelaram o agrupamento das larvas aqui registradas em *Pomacea* sp. no clado formado por espécies do gênero *Echinostoma* ou outros membros da família com dados disponíveis para comparação. As espécies de equinostomatídeos com 31 espinhos descritas da América do Sul (*E. donosoi* e *E. parcespinosum*) provavelmente correspondem a um novo gênero, aparentemente específico para aves da família Rallidae como hospedeiros definitivos e moluscos ampularídeos como primeiro hospedeiro intermediário.

As cercárias aqui identificadas como Echinostomatidae gen. sp. 3, emergidas de *B. straminea* coletada em Contagem, não possuem similaridade morfológica com nenhuma das larvas de representantes da superfamília Echinostomatoidea com ciclo biológico

conhecido. Uma característica peculiar desta cercária é a presença do corpo prefaringeal sem espinhos, ovalado que se sobrepõe à ventosa oral. Larvas semelhantes foram relatadas não mesmo hospedeiro na Argentina (*Echinocercharia* sp. XIV) (FERNÁNDEZ *et al.*, 2014) e em *B. tenagophila* no Uruguai (*Echinostoma* sp. 2) (MARTORELLI, 2003). Uma diferença verificada em relação às larvas do Brasil foi a presença de espinhos no órgão pré-faringeal. Os estudos moleculares também não ofereceram maiores informações além da identificação em nível de família. De fato, em nenhuma das análises realizada, a espécie encontrada agrupou-se em clados contendo espécies dos gêneros disponíveis para comparação. As divergências moleculares com relação às espécies dos gêneros *Echinostoma*, *Euparyphium* e *Echinoparyphium* foram elevadas. Um fato que merece destaque é que, apesar da presença de 37 espinhos no colar cefálico, o parasito estudado não agrupou-se no clado de espécies do gênero *Echinostoma* do complexo “*revolutum*”. De qualquer forma, os dados obtidos a partir dos estágios larvais também apontam que provavelmente trata-se de um novo gênero que ainda não possui sequências disponíveis para comparação.

Uma outra larva foi identificada como Echinostomatidae gen. sp. 4, a qual foi encontrada em *B. glabrata* no estado do Rio de Janeiro. A principal característica diferencial é a presença de colar cefálico com 47 espinhos. Larvas semelhantes foram encontradas em *B. tenagophila* e *B. occidentalis* na Argentina (OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.*, 1997). Segundo KANEV *et al.* (2009) as espécies de *Echinostoma* descritas apresentando 47 espinhos no colar cefálico são: *Echinostoma chloropodis* Zeder, 1800, *Echinostoma corvi* Yamaguti, 1935, *Echinostoma hystricosum* Lie and Umathevy, 1966, *Echinostoma necopinum* Dietz, 1909, *Echinostoma rousseloti* Dollfus, 1956, *Echinostoma sarcinum* Dietz, 1909 e *Echinostoma travassosi* Skrjabin, 1924. Destas, a única das espécies relatada no Brasil é *E. necopinum*, encontrada em *Theristicus caudatus* (FERNANDES *et al.*, 2015). Por outro lado, metacercárias encontradas encistadas no molusco apresentaram a disposição dos espinhos no colar cefálico compatíveis com a conhecida para as espécies do gênero *Edietziana*.

O gênero *Edietziana* (= *Prionosoma*), que inclui parasitos do intestino e cloaca de aves de diferentes ordens (KOSTADINOVA, 2005) já foi registrado em vários países da América do Sul como Brasil, Cuba, Paraguai Uruguai e Venezuela (revisado por FERNANDES *et al.*, 2015). Três das quatro espécies conhecidas ocorrem na região neotropical: *Edietziana malacophilum* (Pérez Viguera, 1944) (46 espinhos), *Edietziana pricei* (Pérez Viguera, 1944) (com um número desconhecido de espinhos) e *Edietziana*

*serrata* (Diesing, 1850) (espécie-tipo do gênero, com 45 espinhos). Esta última espécie é a que possui distribuição geográfica mais ampla, existindo relatos em diferentes espécies de aves na Argentina, Brasil, Venezuela, Cuba e EUA (FERNANDES *et al.*, 2015; LUNASCHI *et al.*, 2015). Apesar das informações morfológicas apontarem a possibilidade das larvas (cercárias e metacercárias) aqui registradas pela primeira vez no Brasil pertencerem a uma espécie do gênero *Edietziana*, estudos adicionais como a obtenção experimental de adultos ou a geração de sequências a partir de parasitos adultos obtidos em aves naturalmente infectadas são necessários para se avançar na identificação desta espécie.

Das cercárias que foram identificadas até o nível de família neste capítulo, a última foi denominada como Echinostomatidae gen. sp. 5. Esta larva apresenta como principal característica diferencial a presença de uma bolsa pré-faríngeal contendo uma roseta com cerca de 50 espinhos e um colar cefálico contendo 51 espinhos. Dentro do gênero *Echinostoma*, apenas *E. transfretanum* Dietz, 1909 foi descrito com essa última característica (YAMAGUTI 1971). Adicionalmente, algumas larvas do tipo equinóstoma foram descritas apresentando bolsa pré-faríngeal semelhante a larva aqui registrada, porém o número de espinhos do colar cefálico é variável, entre 48 e 58. Como exemplo, *Cercaria sudanensis* No.1 encontrada em *Bulinus cortortus* (Michaud, 1829) na Malásia (ARCHIBALD & MARSHALL, 1931; MOHANDAS, 1981) possui, bolsa pré-faríngeal com espinhos, e *find-fold* visível apenas na extremidade posterior da cauda, como na larva aqui descrita. Apesar disso, *C. sudanensis* apresenta medidas maiores e o número de espinhos no colar cefálico desconhecido. Outra larva semelhante foi identificada como *Echinostoma hystricosum* (LIE & UMATHEVY, 1966), encontrada em *Radix rubiginosa* (Michelin, 1831) no Sudão. Neste caso, o número de espinhos cefálicos é diferente (47) e as medidas do corpo e cauda também são maiores que Echinostomatidae gen. sp. 5. Na América do Sul, OSTROWSKI DE NÚÑEZ (1974) descreveu uma cercária similar identificada como *Episthmium suspensum* (Braun, 1901) a partir de estudos experimentais, mas sem o número de espinhos na bolsa prefaríngeal e do colar cefálico. Uma outra larva com morfologia geral similar, mas apresentando 58 espinhos no colar cefálico, foi reportada em *B. tenagophila* no Uruguai e identificadas como Echinostomatidae N° 3 (MARTORELLI *et al.*, 2013).

No que se refere a estudos moleculares, recentemente em um estudo realizado no continente africano por LAIDEMITT *et al.* (2019), foram relatadas algumas cercárias identificadas como pertencentes ao gênero *Patagifer*, as quais também apresentam bolsa

pré-faríngeal com espinhos, mas em menor número (20 no total). As espécies do gênero *Patagifer* são parasitos que possuem íbis (família Threskiornithidae) como hospedeiros definitivos e moluscos dulceaquícolas como primeiros e segundos hospedeiros intermediários (FALTYNKOVA *et al.*, 2008). No Brasil (e em outros países da América do Sul), existem relatos de duas espécies: *Patagifer bilobus* (Rudolphi, 1819) Dietz, 1909 e *Patagifer consimilis* Dietz, 1909 (revisado por FERNANDES *et al.*, 2015). Destaca-se que as cercárias de *Patagifer* descritas por LAIDEMITT *et al.* (2019) possuem numerosos corpúsculos calcários (90-100 grânulos a cada lado) em cada canal excretor principal, como verificado no isolado do Brasil. A inexistência de dados morfométricos para essas cercárias impossibilita a comparação. É possível que a cercária em estudo pertença ao gênero *Patagifer*, mas, estudos moleculares ou experimentais são indispensáveis para se avançar na sua identificação. De qualquer forma, larvas com essa morfologia não foram registradas até o momento no Brasil.

No presente estudo, larvas do tipo equinóstoma sem espinhos no colar cefálico foram encontradas infectando quatro espécies de caramujos planorbídeos do Brasil. Os estudos realizados por abordagem molecular revelou tratar-se de trematódeos do gênero *Rhopalias*, parasitos intestinais de gambás (RADEV *et al.*, 2005; HAVERKOST & GARDNER, 2008). No geral, a análise morfológica não revelou diferenças morfológicas ou morfométricas evidentes entre os diferentes isolados avaliados. A principal característica distintiva destas larvas é a presença poucas concreções circulares (2 a 3) em cada túbulo principal do sistema excretor, característica que os separa de outros equinostomatídeos larvais conhecidos. As cercárias de *Rhopalias* spp. aqui identificados são semelhantes a uma larva originalmente descrita como *Cercaria macrogranulosa* por RUIZ (1953) encontrada em *B. glabrata* em Belo Horizonte.

Até o momento, os únicos estudos experimentais envolvendo larvas identificadas como *Cercaria macrogranulosa* foram realizados por OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.* (1990) na Argentina, que relataram a penetração e encistamento de cercárias em girinos, revelando pela primeira vez o possível envolvimento de anfíbios na transmissão desse parasito desconhecido. No presente estudo, metacercárias contendo 2-3 grandes concreções circulares em cada ducto coletor principal do sistema excretor foram encontrados em girinos de *Rhinella* sp. naturalmente infectados coletados no mesmo corpo d'água onde foram encontrados moluscos infectados por *Rhopalias* sp. 2. Este achado sugere fortemente que anuros atuam como segundos hospedeiros intermediários no ciclo de vida de *Rhopalias* spp. Metacercárias morfológicamente semelhantes foram

relatadas na faringe de girinos de *Scinax nasicus* (Cope, 1862) e *Odontophrynus americanus* (Duméril e Bibron, 1841) na Argentina (HAMANN & GONZÁLEZ, 2009). É importante notar que os anuros também estão envolvidos na transmissão trófica do parasito ao hospedeiro definitivo em espécies de dois gêneros filogeneticamente relacionados a *Rhopalias* spp., isto é, *Cathaemasia* e *Ribeiroia* (SZIDAT, 1939; YAMAGUTI, 1975; JOHNSON *et al.*, 2004; TKACH *et al.*, 2016). Os anfíbios podem fazer parte da dieta de gambás didelídeos (STIEGLITZ & KLIMSTRA 1962; VALERIO 1969; TOLEDO *et al.*, 2007), o que pode favorecer a transmissão trófica de *Rhopalias* spp. para o hospedeiro definitivo.

Com base nos dados morfológicos, todas as amostras avaliadas foram consideradas indistinguíveis de *C. macrogranulosa*. Embora os genes nucleares tenham revelado diferenças moleculares baixas entre as larvas presentes nas diferentes amostras, os dados obtidos para o marcador *Nad-1* revelam inequivocamente a ocorrência de três espécies de *Rhopalias* no material estudado. As larvas identificadas como *Rhopalias* sp. 2, foram encontradas em dois gêneros diferentes de planorbídeos (*Biomphalaria* e *Drepanotrema*) em duas localidades distantes cerca de 600km. A divergência molecular verificada entre esses isolados é semelhante à divergência intraespecífica conhecida para outras espécies de Echinostomatidae (KOSTADINOVA *et al.*, 2003; LAIDEMITT *et al.*, 2019; MOHANTA *et al.* 2019). Curiosamente, 100% de similaridade em *Nad-1* foi verificada em *Rhopalias* sp. 1 encontrado em dois gêneros de planorbídeos distantes filogeneticamente (*Biomphalaria* e *Gundlachia*), mas da mesma localidade. Os dados aqui apresentados podem indicar baixa especificidade de *Rhopalias* spp. para os planorbídeos que atuam como primeiros hospedeiros intermediários.

O presente estudo representa a primeira identificação da atuação de moluscos como primeiros hospedeiros intermediários de trematódeos do gênero *Rhopalias*. No estado de Minas Gerais, Brasil, *R. coronatus* é a única espécie do gênero anteriormente conhecida, relatada no gambá de orelha branca, *Didelphis albiventris* Lund, 1840, de Belo Horizonte (QUINTÃO & SILVA & COSTA, 1999). Recentemente, sequências de *Cox-1* foram obtidas para isolados mexicanos de *R. coronatus* (LÓPEZ-CABALLERO *et al.*, 2019), mas esta espécie é distinta de *Rhopalias* sp. 1 e *Rhopalias* sp. 2. A possibilidade de *Rhopalias* sp. 3 do presente estudo ser uma dessas espécies sequenciadas no México não pode ser descartada. Por outro lado, as larvas aqui relatadas podem pertencer a algumas das outras seis espécies de *Rhopalias* já relatadas em marsupiais na América do Sul, a saber: *Rhopalias baculifer* Braun, 1900, *Rhopalias caballeroi* Kifune & Uyema, 1982,

*Rhopalias caucensis* Rivillas, Caro, Carvajal & Vélez, 2004, *Rhopalias coronatus* (Rudolphi, 1819), *Rhopalias horridus* (Diesing, 1850) e *R. macracanthus* (FERNANDES *et al.*, 2015). Além disso, a possibilidade da existência de espécies crípticas em *Rhopalias* não pode ser descartada.

Os resultados moleculares obtidos neste estudo revelam que apesar dos genes nucleares permitirem uma identificação inequívoca em nível genérico, as baixas variações interespecíficas verificadas em *Rhopalias* spp. dificultam o uso desses marcadores para identificação específica. As sequências *Cox-1* (região barcode) foram obtidas para três espécies de *Rhopalias* do México (LÓPEZ-CABALLERO *et al.*, 2019); no entanto, os primers projetados por VAN STEENKISTE *et al.* (2015) para a mesma região apresentaram resultados satisfatórios no presente estudo, apenas duas espécies (*Rhopalias* sp. 1 e *Rhopalias* sp. 2). Por outro lado, a obtenção de sequências do marcador *Nad-1*, amplamente utilizado no estudo de Echinostomatoidea (LEDWÓN *et al.*, 2016; HENEBERG *et al.*, 2018; MOHANTA *et al.*, 2018; LAIDEMITT *et al.*, 2019; ASSIS *et al.*, 2021), apresentou melhor performance, permitindo à amplificação de todas as amostras.

Cercárias do tipo equinóstoma sem espinhos no colar cefálico e com divertículo esôfagiano foram encontradas em *B. straminea* e *B. glabrata*. As análises morfológicas e moleculares permitiram a identificação de *Ribeiroia* sp. A espécie tipo do gênero, *R. insignis* Travassos, 1939, foi descrita de garças no Brasil. Anos mais tarde, foi considerada como sinônimo júnior de *R. ondatrae* (Price, 1931) (DUBOIS & MAHON, 1959; JOHNSON *et al.*, 2004). Outros relatos em aves na América do Sul foram realizados na Argentina e Colômbia (FERNANDES *et al.*, 2015). Este gênero foi descrito inicialmente como pertencente à família Psilostomidae, porém, TKACH *et al.* (2016) na revisão mais recente da superfamília Echinostomatoidea, determinaram a sua inclusão na família Echinostomatidae. Nas últimas décadas, o gênero *Ribeiroia* adquiriu importância ecológica e ambiental, uma vez que o envolvimento de *R. ondatrae* na ocorrência de malformações em membros de anfíbios, e assim redução e mesmo extinção de espécies de anfíbios, foi demonstrado na América do Norte (JOHNSON *et al.*, 2002; 2004; 2009).

Os primeiros hospedeiros intermediários de *Ribeiroia* spp. são moluscos planorbídeos do gênero *Biomphalaria*, sendo *B. prona*, *B. orbigny*, *B. straminea* e *B. glabrata* já descritos como hospedeiros naturais na Argentina, Venezuela e Brasil (NASIR *et al.*, 1969; NASIR & DÍAZ, 1973; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1981a; OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.*, 1991; PINTO *et al.*, 2013b). No Brasil, além de

cercárias e adultos, há o registro do encontro de metacercárias em peixes, *Oreochromis niloticus* (PINTO *et al.* 2014). Um fato novo inerente à biologia de *Ribeiroia* spp. foi o achado de metacercárias de uma espécie deste gênero em *Biomphalaria sudanica* na África (LAIDEMITT *et al.* 2019).

Na análise molecular realizada com o marcador 28S, foi possível confirmar que as larvas encontradas pertenciam ao gênero *Ribeiroia*. Os resultados das análises envolvendo a região ITS2 evidenciaram que os isolados do presente estudo são distintos de *R. ondatrae* dos Estados Unidos, e de *R. marini* de Porto Rico, apresentando maior similaridade com *Ribeiroia* sp. da Argentina (WILSON *et al.*, 2005; DAVIES *et al.*, 2015). Finalmente, a análise com o marcador mitocondrial *Cox-1* demonstrou divergência nucleotídica de 12% em relação a *R. ondatrae* dos Estados Unidos, indicando tratar-se de espécies distintas. Assim, é possível que a validade de *R. insignis* seja reestabelecida para a espécie de *Ribeiroia* encontrada na América do Sul.

## 5.2- CAPÍTULO 2: Larvas de trematódeos da Superfamília Plagiorchioidea em moluscos do Brasil

### 5.2.1- Revisão da literatura

A superfamília Plagiorchioidea está representada por parasitos dos tratos digestivo, respiratório urogenital de peixes e tetrápodes (BRAY *et al.*, 2008). É atualmente composta por 18 famílias que incluem mais de 100 gêneros. Estudos filogenéticos robustos envolvendo representantes de várias espécies deste grupo foram realizados no começo dos anos 2000 e forneceram suporte para este táxon (TKACH *et al.*, 2000; 2001; CRIBB *et al.*, 2001a; OLSON *et al.*, 2003). Na América do Sul, 93 espécies já foram relatadas parasitando anfíbios, répteis, mamíferos e peixes (58 delas no Brasil) (KOHN *et al.*, 2007; FERNANDES e KOHN, 2014; FERNANDES *et al.*, 2015). Apesar deste número representativo de espécies conhecidas, a maioria não possui moluscos transmissores e ciclo biológico conhecidos. Na América do Sul já foram relatadas 70 larvas do tipo xifidiocercária em moluscos dulceaquícolas (Tabela 14). Destas, apenas 7 foram associadas aos adultos após a elucidação experimental dos respectivos ciclos biológicos. Do ponto de vista médico, existem alguns relatos de parasitos desta superfamília infectando seres humanos. Por exemplo, o potencial zoonótico de *Plagiorchis* spp. foi caracterizado em alguns países da Ásia (ASADA *et al.*, 1962; YU & MOTT, 1994; HONG *et al.*, 1996; GUK *et al.*, 2007).

O ciclo biológico das espécies de Plagiorchioidea é complexo, envolvendo até três hospedeiros intermediários. Moluscos gastrópodes são obrigatoriamente os primeiros hospedeiros intermediários. Já o segundo hospedeiro intermediário, a depender da espécie, pode ser organismos de diferentes grupos zoológicos como anfíbios, moluscos, anelídeos e artrópodes. O tipo cercariano típico deste grupo são as xifidiocercárias, que também é verificado em outras três superfamílias (Microphalloidea, Gorgoderoidea e Allocreadioidea), que compõem a subordem Xiphidiata (OLSON *et al.*, 2003). Estas larvas apresentam estile na ventosa oral, sendo o próprio nome do tipo cercariano (Gr. *xiphos* = espada) uma alusão à presença desta estrutura quitinosa que pode apresentar tamanho e formato distintos, dependendo da espécie (NASIR, 1986; OSTROWSKI DE NÚÑEZ & HAMANN, 2013). Acredita-se que o estilete é uma adaptação deste tipo de cercárias para penetrar na cutícula de artrópodes aquáticos que a maioria destes parasitos utilizam como segundos hospedeiros intermediários (MCMULLEN, 1937; OLSON *et al.*,

2003). A morfologia destas larvas é muito variável. A cauda, que é simples, pode apresentar membrana natatória. Estas larvas podem apresentar ocelos pigmentados e possuir ventosas de tamanho relativo diferente, além de glândulas de penetração com número e disposição variáveis. Um grupo particular de xifidiocercárias, denominado virgulata, apresenta uma estrutura glandular na ventosa oral denominada de “órgão virgula”.

No Brasil, embora existam diversos morfotipos de xifidiocercárias registrados (CARVALHO *et al.*, 2001; BOAVENTURA *et al.*, 2002; PAVIOTTI-FISHER *et al.*, 2019), os estudos visando à identificação taxonômica destas larvas são escassos. A maioria dos registros foram baseados em larvas identificadas como táxon de grupos coletivos (*Cercaria* Müller, 1774) (e.g. RUIZ, 1952 a;b; 1953) ou apenas em nível de tipos cercarianos (BOAVENTURA *et al.*, 2002; SOUZA & MELO, 2012; SILVA & MELO, 2013). Várias xifidiocercárias já têm sido associadas aos respectivos adultos através de estudos experimentais (revisado por YAMAGUTI, 1975; NASIR, 1986). Contudo, ressalta-se que este tipo de abordagem para a identificação de xifidiocercárias encontra dificuldades logísticas, especialmente ao se considerar os tipos de hospedeiros utilizados neste grupo de trematódeos, que inclui vertebrados de sangue frio (anfíbios e répteis) e artrópodes aquáticos, grupos difíceis de se manter em condições laboratoriais.

Recentemente a taxonomia integrativa tem sido utilizada para a identificação e avaliação da posição filogenética de espécies de trematódeos da subordem Xiphidiata encontradas em diferentes partes do mundo (OTRANTO *et al.*, 2007; MARTÍNEZ-SALAZAR *et al.*, 2016; AL QURAI SHY *et al.*, 2019; SOKOLOV *et al.*, 2020). Com relação aos estágios larvais, alguns avanços também têm sido alcançados (SOKOLOV *et al.*, 2020, DAVIES *et al.*, 2021). Por outro lado, a ausência de sequências referências para os respectivos adultos frequentemente impossibilita a identificação de xifidiocercárias, as quais permanecem identificadas apenas em nível de gênero, famílias ou superfamílias (KUDLAI *et al.*, 2015; ENABULELE *et al.*, 2017; DELLAGNOLA *et al.*, 2019; SHCHENKOV *et al.*, 2019; KRUPENKO *et al.*, 2020; LOPES *et al.*, 2021).

No Brasil, os estudos moleculares envolvendo larvas destes parasitos são escassos. Em um trabalho recente, LOPES *et al.* (2021) relatam o encontro de uma xifidiocercária em *Melanoides tuberculata*. Esta larva, que provavelmente representa um novo parasito invasor, foi identificada apenas como pertencente à família Lecithodendriidae (pertencente a superfamília Microphaloidea). Larvas com similaridades genéticas com espécies do gênero *Paralecithodendrium* foram encontradas no molusco tiarídeo

*Aylacostoma chloroticum* no Rio Paraná (ONACA *et al.*, 2020). Essa escassez no conhecimento apontam o longo caminho a ser percorrido no que se refere ao estudo de xifidiocercárias encontradas em moluscos no país.

TABELA 14- Xifidiocercárias encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul

<b>Espécie</b>	<b>Molusco</b>	<b>Localidade</b>	<b>Fig.</b>	<b>Referência</b>
			<b>Fig. 30</b>	
<i>Levinseniella cruzi</i>	<i>Heleobia australis</i> ; <i>Heleobia conexa</i> ; <i>Heleobia parchappii</i>	Argentina	<b>a</b>	Alda & Martorelli (2014); Martorelli (1988)
Macrocercaria sp. 1	<i>Pisidium</i> sp.	Argentina	<b>b</b>	Ostrowski de Núñez (1981b)
<i>Magnivitellinum saltaensis</i>	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Argentina	<b>c</b>	Davies <i>et al.</i> (2021)
<i>Maritrema bonariensis</i>	<i>Heleobia australis</i> ; <i>Heleobia conexa</i>	Argentina	<b>d</b>	Etchegoin <i>et al.</i> (2012); Alda <i>et al.</i> (2013); Parietti <i>et al.</i> (2013)
<i>Maritrema orensensis</i>	<i>Heleobia australis</i>	Argentina	<b>e</b>	Alda <i>et al.</i> (2013)
<i>Microphallus simillimus</i>	<i>Biomphalaria peregrina</i> <i>Heleobia australis</i> ; <i>Heleobia conexa</i> ; <i>Heleobia parchappii</i>	Argentina	**	Martorelli (1991); Merlo & Etchegoin (2011); Etchegoin <i>et al.</i> (2012) Merlo <i>et al.</i> (2017; 2019); Parietti <i>et al.</i> (2020)
<i>Microphallus szidati</i>	<i>Heleobia australis</i> ; <i>Heleobia conexa</i> ; <i>Heleobia parchappii</i>	Argentina	**	Etchegoin <i>et al.</i> (2012); Parietti <i>et al.</i> (2013); Martorelli (1986c;d); Merlo & Etchegoin (2011); Etchegoin <i>et al.</i> (2012); Martorelli (1986c;d); Merlo <i>et al.</i> (2017; 2019); Parietti <i>et al.</i> (2020)
<i>Phaneropsolus</i> sp.	<i>Asolene platae</i>	Argentina	<b>f</b>	Dellagnola <i>et al.</i> (2019)
<i>Renicola</i> sp.	<i>Heleobia australis</i>	Argentina	<b>g</b>	Alda & Martorelli (2014)
<i>Travtrema stenocotyle</i>	<i>Pomacea canaliculata</i>	Argentina	<b>h</b>	Ostrowski de Núñez (1979)
Plagiorchiid	<i>Chilina dombeyana</i>	Argentina	**	Flores & Semenas (2008)
Xiphidiocercaria I cf. <i>Cercaria minense</i>	<i>B. straminea</i> ; <i>B. orbignyi</i>	Argentina	<b>i</b>	Ostrowski de Núñez <i>et al.</i> (1990)
Xiphidiocercaria II	<i>B. straminea</i>	Argentina	<b>J</b>	Ostrowski de Núñez <i>et al.</i> (1990)
Xiphidiocercaria sp. III	<i>Heleobia Piscium</i>		<b>k</b>	Ostrowski de Núñez (1975)

TABELA 14: *Continuação...*

Xiphidiocercaria sp. 1	<i>Heleobia conexa</i> ; <i>Biomphalaria peregrina</i>	Argentina	<b>l</b>	Etchegoin & Martorelli (1998); Morris (1976)
Xiphidiocercaria sp. 2	<i>Heleobia australis</i> ; <i>Heleobia conexa</i> ; <i>Biomphalaria orbignyi</i> ; <i>Biomphalaria tenagophila</i>	Argentina	<b>m</b>	Etchegoin & Martorelli (1998)
Xiphidiocercaria sp. I	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Argentina	<b>n</b>	Ostrowski de Núñez (1974)
Xiphidiocercaria sp. II	<i>Drepanotrema kermatoides</i>	Argentina	<b>o</b>	Ostrowski de Núñez (1974)
Xiphidiocercaria sp. III aff. <i>Haematholoechus</i>	<i>Drepanotrema lucidum</i>	Argentina	<b>p</b>	Hamann <i>et al.</i> (1993)
Xiphidiocercaria sp. IV	<i>Heleobia piscium</i> ; <i>Drepanotrema depressissimum</i>		<b>q</b>	Ostrowski de Núñez (1981b); Hamann <i>et al.</i> (1993)
<b>Fig. 31</b>				
Xiphidiocercaria V cf. <i>lutzi</i>	<i>Biomphalaria occidentalis</i>	Argentina	<b>a</b>	Ostrowski de Núñez <i>et al.</i> (1991)
Xiphidiocercaria gen. sp. 1	<i>Biomphalaria peregrina</i>	Argentina	<b>b</b>	Parietti <i>et al.</i> (2015)
Xiphidiocercaria gen. sp. 3	<i>Heleobia parchappii</i>	Argentina	<b>c</b>	Merlo <i>et al.</i> (2014)
Xiphidiocercaria gen. sp. 4	<i>Heleobia parchappii</i>	Argentina	<b>d</b>	Merlo <i>et al.</i> (2014)
Xiphidiocercária sp. A	<i>Heleobia parchappii</i>	Argentina	<b>e</b>	Morris (1976)
Xiphidiocercária sp. B	<i>Heleobia parchappii</i>	Argentina	<b>f</b>	Morris (1976)
Xiphidiocercaria sp. IV	<i>Drepanotrema depressissimum</i>	Argentina	<b>g</b>	Ostrowski de Núñez (1993); Hamann <i>et al.</i> (1993)
<i>Cercaria guaibensis</i> 2	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil	<b>h</b>	Veitenheimer-Mendes (1981)
<i>Cercaria guaibensis</i> 7	<i>Biomphalaria tenagophila</i> <i>Biomphalaria peregrina</i>	Brasil	<b>i</b>	Veitenheimer-Mendes <i>et al.</i> (1995)
<i>Cercaria lutzi</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i> ; <i>B. tenagophila</i>	Brasil	<b>j</b>	Ruiz (1943; 1952); Moraes <i>et al.</i> (2009); Ohlweiler <i>et al.</i> 2013
<i>Cercaria minense</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i> ; <i>Biomphalaria tenagophila</i>	Brasil	<b>k</b>	Ruiz (1953); Ohlweiler <i>et al.</i> (2013)

TABELA 14: *Continuação...*

<i>Cercaria ornata</i>	<i>Pseudosuccinea columella</i>	Brasil	<b>l</b>	Eduardo <i>et al.</i> (2012); Ohlweiler <i>et al.</i> (2013)
<i>Cercaria santense</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Brasil	<b>m</b>	Ruiz (1952a); Ohlweiler <i>et al.</i> (2013)
Ornatae cercaria	<i>Stenophysa marmorata</i> ; <i>Drepanotrema Cimex</i> ; <i>Pseudosuccinea columella</i>	Brasil	*	Ohlweiler <i>et al.</i> (2013)
<i>Stomylotrema gratosus</i>	<i>Pomacea maculata</i>	Brasil	<b>n</b>	Pinto <i>et al.</i> (2015c)
Virgulate cercaria	<i>Pomacea sp.</i>	Brasil	*	Ohlweiler <i>et al.</i> (2013)
Xiphidiocercaria	<i>Stenophysa marmorata</i>	Brasil	<b>o</b>	Boaventura <i>et al.</i> (2002)
Xiphidiocercaria S1	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Brasil	<b>p</b>	Silva & Melo (2013)
Xiphidiocercaria S2	<i>Stenophysa marmorata</i>	Brasil	<b>q</b>	Silva & Melo (2013)
Xiphidiocercaria SM2	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Brasil	**	Souza & Melo (2012)
<b>Fig. 32</b>				
Xiphidiocercaria SM3	<i>Stenophysa marmorata</i>	Brasil	<b>a</b>	Souza & Melo (2012)
Xiphidiocercaria I	<i>Drepanotrema kermatoides</i>	Brasil	<b>b</b>	Veitenheimer-Mendes (1982)
<i>Cercaria Abdulwaheedi</i>	<i>Biomphalaria straminea</i>	Venezuela	<b>c</b>	Nasir (1982)
<i>Cercaria Abdulwameedi</i>	<i>Biomphalaria straminea</i>	Venezuela	<b>d</b>	Nasir (1982)
<i>Cercaria allomacarapensis</i>	<i>Marisa cornuaretis</i>	Venezuela	<b>e</b>	Nasir & Díaz (1968)
<i>Cercaria arismendi</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>f</b>	Nasir & Díaz (1969)
<i>Cercaria baldai</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Venezuela	<b>g</b>	Nasir (1964b)
<i>Cercaria chacaracualensis</i>	<i>Marisa cornuarietis</i>	Venezuela	<b>h</b>	Nasir & Acuña (1966a)
<i>Cercaria cumanensis</i>	<i>Marisa cornuarietis</i>	Venezuela	<b>i</b>	Nasir (1965)
<i>Cercaria etgesi</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>j</b>	Nasir (1963)
<i>Cercaria farakhanweri</i>	<i>Pomacea urceus</i>	Venezuela	<b>k</b>	Nasir (1971)
<i>Cercaria guanipensis</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>l</b>	Nasir & Díaz (1973a)
<i>Cercaria guaraunensis</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>m</b>	Nasir & Díaz (1968)
<i>Cercaria homocotylea</i>	<i>Pomacea urceus</i>	Venezuela	<b>n</b>	Nasir & Acuña (1966b)

TABELA 14: *Continuação...*

<i>Cercaria latigazica</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>o</b>	Nasir <i>et al.</i> (1969)
			<b>Fig. 33</b>	
<i>Cercaria marisa</i>	<i>Marisa cornuarietis</i>	Venezuela	<b>a</b>	Nasir & Díaz (1968)
<i>Cercaria paracumanensis</i>	<i>Marisa cornuarietis</i>	Venezuela	<b>b</b>	Nasir (1971)
<i>Cercaria peculiaristilata</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>c</b>	Nasir & Acuña (1966b)
<i>Cercaria pifanoi</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>d</b>	Nasir & Díaz (1967)
<i>Cercaria pseudopifanoi</i>	<i>Marisa cornuarietis</i>	Venezuela	<b>e</b>	Nasir <i>et al.</i> (1969)
<i>Cercaria pseudopolyadena</i>	<i>Marisa cornuarietis</i>	Venezuela	<b>f</b>	Nasir & Guevara (1968)
<i>Cercaria scorzai</i>	<i>Pachychilus laevisimus</i>	Venezuela	<b>g</b>	Nasir <i>et al.</i> (1966)
<i>Cercaria stenophvenezua</i>	<i>Physa venezuelensis</i>	Venezuela	<b>h</b>	Nasir & Díaz (1973b)
<i>Cercaria unica</i>	<i>Physa venezuelensis</i>	Venezuela	<b>i</b>	Nasir & Díaz (1973b)
<i>Cercaria urceus</i>	<i>Pomacea urceus</i>	Venezuela	<b>j</b>	Nasir & Acuña (1966a)
<i>Cercaria yacalicola</i>	<i>Pomacea glauca</i>	Venezuela	<b>k</b>	Nasir <i>et al.</i> (1969)
Xiphidocercaria sp. I	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Venezuela	<b>l</b>	Ostrowski de Núñez (1982)
Xiphidocercaria sp. II	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Venezuela	<b>m</b>	Ostrowski de Núñez (1982)
Xiphidocercaria sp. III	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Venezuela	<b>n</b>	Ostrowski de Núñez (1982)
<i>Cercaria Xiphidiocerca</i>	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Uruguai	<b>o</b>	Martorelli <i>et al.</i> (2013)

\*Figura de má qualidade. \*\*Figura não disponível.

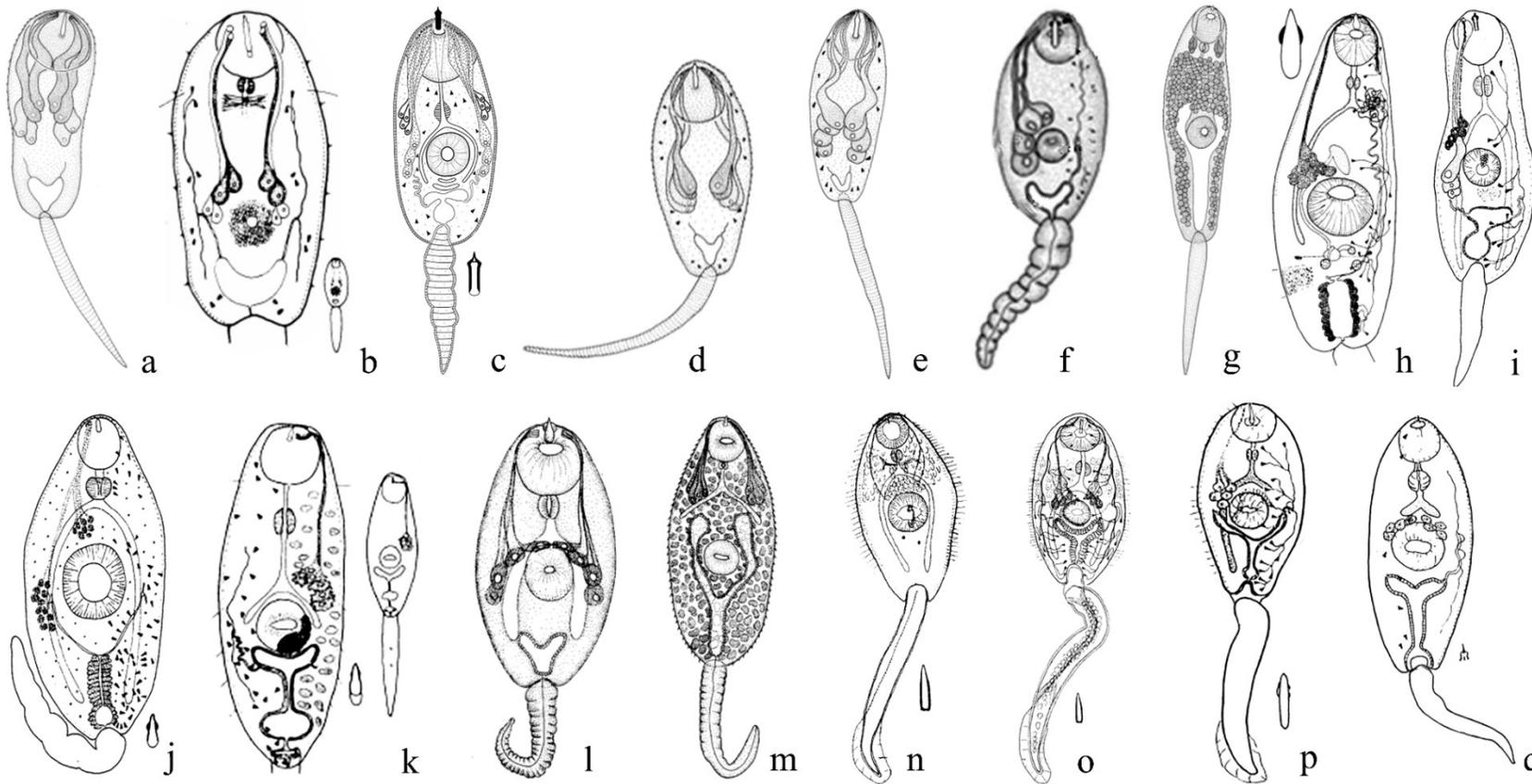


FIGURA 30- Xifidiocercárias encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul. **a.** *Levinseniella cruzi*; **b.** *Macrocercaria* sp. 1; **c.** *Magnivitellinum saltaensis*; **d.** *Maritrema bonariensis*; **e.** *Maritrema orensensis*; **f.** *Phaneropsolus* sp.; **g.** *Renicola* sp.; **h.** *Travtrema stenocotyle*; **i.** Xiphidiocercaria I cf. *Cercaria minense*; **j.** Xiphidiocercaria II; **k.** Xiphidiocercaria III; **l.** Xiphidiocercaria sp. 1; **m.** Xiphidiocercaria sp. 2; **n.** Xiphidiocercaria sp. I; **o.** Xiphidiocercaria sp. II; **p.** Xiphidiocercaria sp. III aff. *Haematolocechus*; **q.** Xiphidiocercaria sp. IV. Para informações de cada uma das larvas consultar Tabela 14.

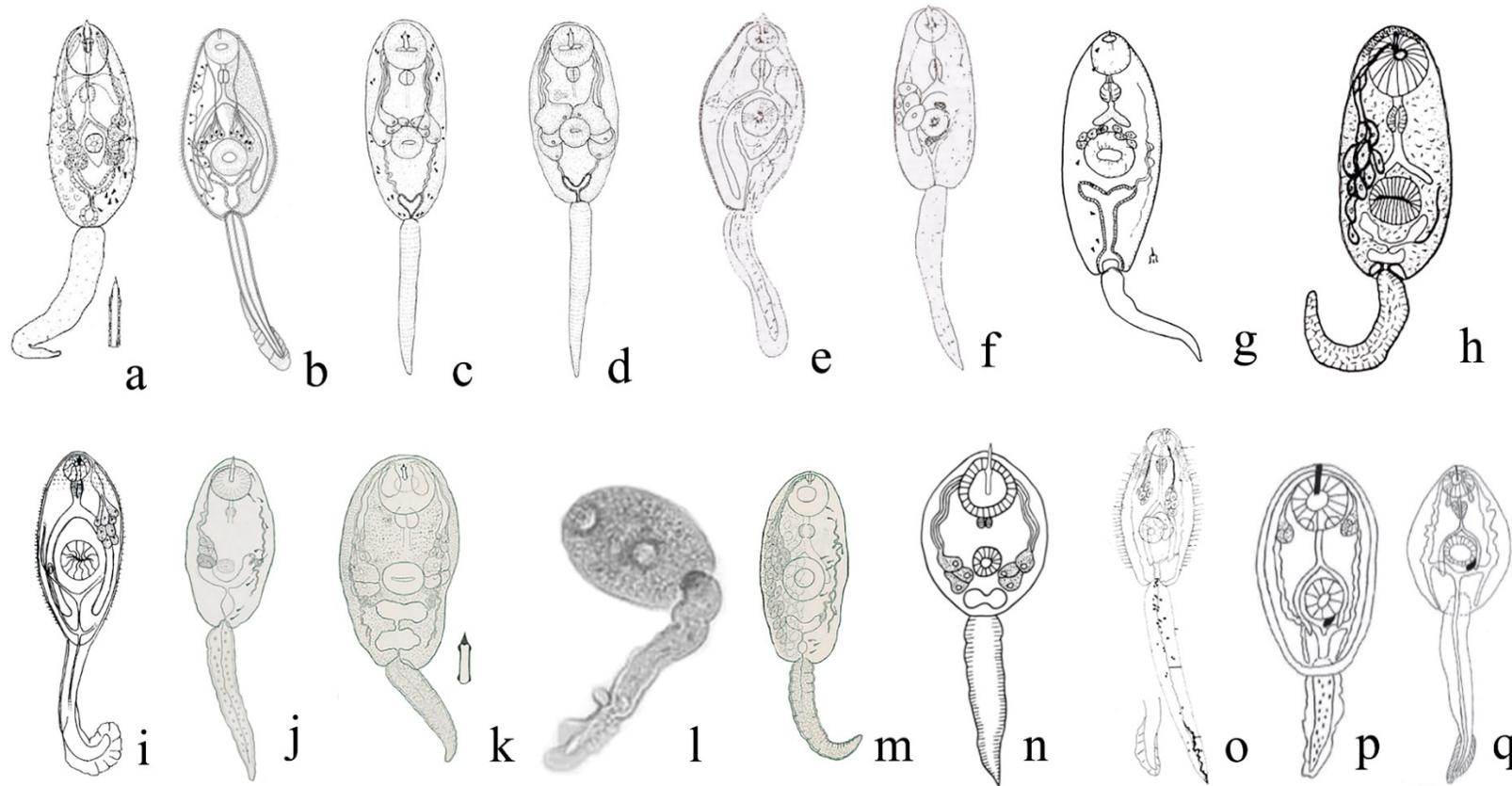


FIGURA 31- Xifidiocercárias encontradas em moluscos dulceaquícolos na América do Sul **a.** Xifidiocercaria V cf. *lutzi*; **b.** Xifidiocercaria gen. sp. 1; **c.** Xifidiocercaria gen. sp. 3; **d.** Xifidiocercaria gen. sp. 4; **e.** Xifidiocercaria sp. A; **f.** Xifidiocercaria sp. B; **g.** Xifidiocercaria sp. IV; **h.** *Cercaria guaibensis* 2; **i.** *Cercaria guaibensis* 7; **j.** *Cercaria lutzi*; **k.** *Cercaria minense*; **l.** *Cercaria ornata*; **m.** *Cercaria santense*; **n.** *Stomylotrema graciosus*; **o.** Xifidiocercaria; **p.** Xifidiocercaria S1; **q.** Xifidiocercaria S2. . Para informações de cada uma das larvas consultar Tabela 14.

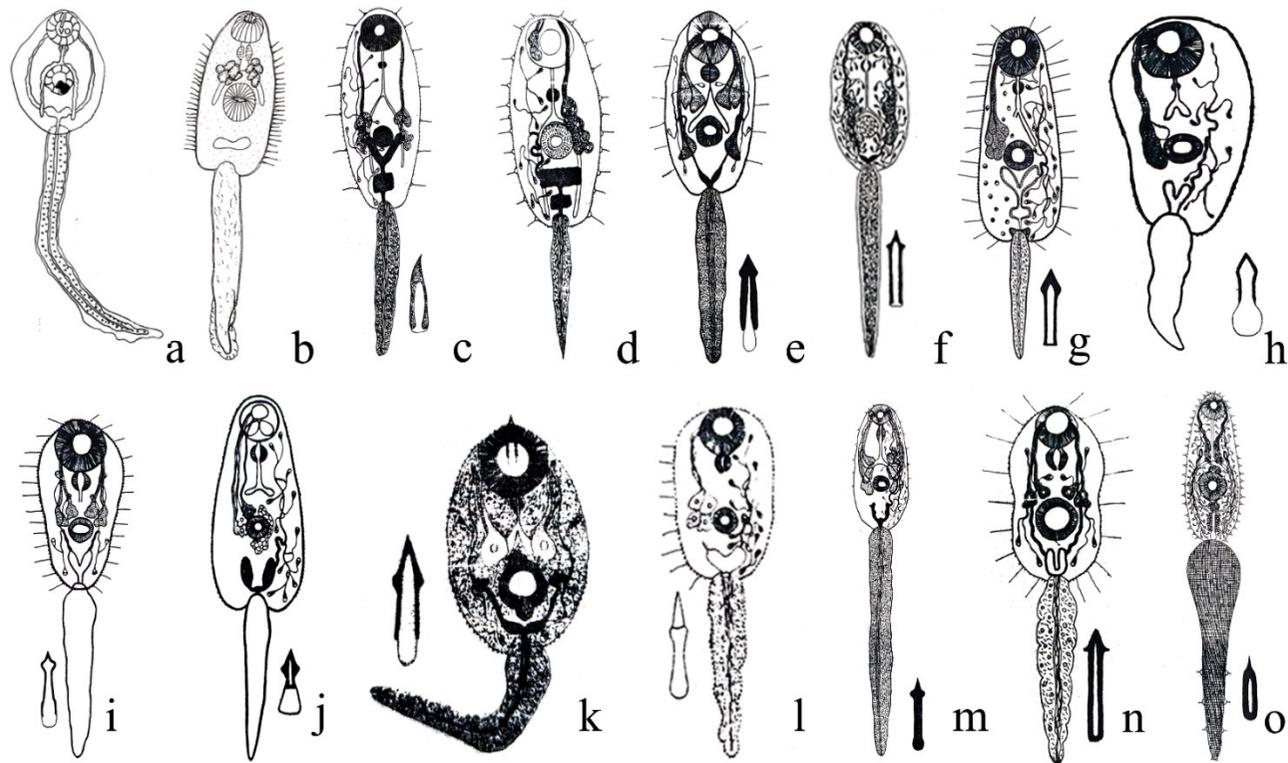


FIGURA 32- Xifidiocercárias encontradas em moluscos dulceaquícolos na América do Sul Xifidiocercárias encontradas em moluscos dulceaquícolos na América do Sul **a.** Xiphidiocercaria SM3; **b.** Xiphidiocercaria I; **c.** *Cercaria abdulwaheedi*; **d.** *Cercaria abdulwameedi*; **e.** *Cercaria allomacarapensis*; **f.** *Cercaria arismendi*; **g.** *Cercaria baldai*; **h.** *Cercaria chacaracualensis*; **i.** *Cercaria cumanensis*; **j.** *Cercaria etgesi*; **k.** *Cercaria farakhanweri*; **l.** *Cercaria guanipensis*; **m.** *Cercaria guaraunensis*; **n.** *Cercaria homocotylea*; **o.** *Cercaria latigazica*. . Para informações de cada uma das larvas consultar Tabela 14.

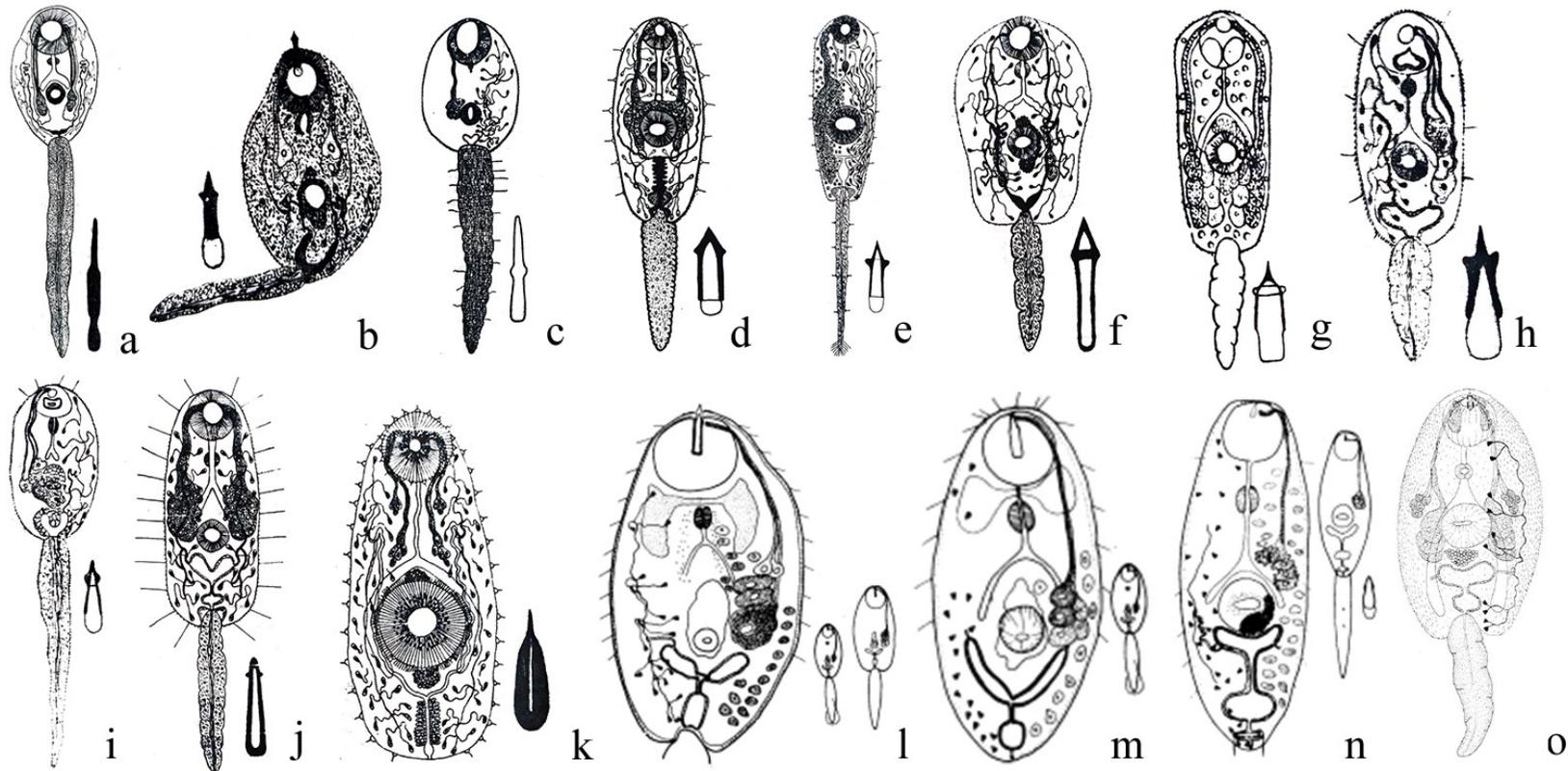


FIGURA 33- Xifidiocercárias encontradas em moluscos dulceaquícolas na América do Sul. **a.** *Cercaria marisa*; **b.** *Cercaria paracumanensis*; **c.** *Cercaria peculiaristilata* **d.** *Cercaria pifanoi*; **e.** *Cercaria pseudopifanoi*; **f.** *Cercaria pseudopolyadena*; **g.** *Cercaria scorzai*; **h.** *Cercaria stenophvenezua*; **i.** *Cercaria unica*; **j.** *Cercaria urceus*; **k.** *Cercaria yacalicola*; **l.** Xiphidocercaria sp. I; **m.** Xiphidocercaria sp. II; **n.** Xiphidocercaria sp. III; **o.** *Cercaria Xiphidocerca*. Para informações de cada uma das larvas consultar Tabela 14.

## 5.2.2- Resultados

Cinco larvas do tipo xifidiocercária foram identificadas como pertencentes à superfamília Plagiorchioidea neste estudo. Os moluscos infectados foram identificados como *Pseudosuccinea columella*, *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria glabrata* e *Stenophysa marmorata*. As cinco espécies identificadas foram: *Haematoloechus* sp., *Magnivitellinum* sp., *Haematoloechidae* gen. sp., *Plagiorchioidea* gen. sp. e *Renifer* sp. As informações obtidas para cada uma dessas são apresentadas a seguir.

### 5.2.2.1- *Haematoloechus* sp. (Plagiorchioidea: Haematoloechidae)

Localidade: Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Pseudosuccinea columella*.

#### 5.2.2.1.1- Caracterização morfológica

O estudo morfológico desta espécie (e de metacercárias obtidas experimentalmente) foi previamente realizado por PINTO (2013), sendo a espécie identificada como *Haematoloechidae* gen. sp.

#### 5.2.2.1.2- Estudo molecular

Um fragmento de 1143 pb do gene 28S foi obtido para as cercárias emergidas de *P. columella*. O alinhamento final utilizado nas análises filogenéticas estava constituído por 1173 pb. Os resultados obtidos revelaram que o isolado brasileiro se agrupou em um clado bem suportado contendo espécies de *Haematoloechus* (Figura 38). Além disso, foi verificada a formação de um subclado contendo a amostra do Brasil e a espécie tipo do gênero, *Haematoloechus complexus* (divergência molecular de 3,8%). Considerando-se as outras sequências de espécies do gênero *Haematoloechus* utilizadas para comparação, as divergências moleculares variaram entre 2,2% e 7,9%. Com relação à região ITS1-5.8S-ITS2, um fragmento de 1000 pb foi obtido (alinhamento final de 753 pb). As análises filogenéticas (Figura 39) também revelaram que o isolado brasileiro de *Haematoloechus* sp. agrupou-se em um mesmo clado com *H. complexus*, porém com baixo suporte para a análise de inferência bayesiana. A divergência molecular em relação a essa espécie foi de

2,9%. Em relação a outras espécies do gênero, as diferenças variaram entre 2,7 e 9,6%. Considerando-se os outros gêneros utilizados para comparação, os percentuais de divergências foram maiores (8,4-13,3%) (Anexo 2: Tabelas 15 e 16).

#### 5.2.2.1.3- Comentários taxonômicos

As características das cercárias avaliadas no presente estudo estão de acordo com as relatadas para espécies de *Haematoloechus* por diferentes autores. Cercárias semelhantes foram encontradas em *P. columella* nos EUA e identificadas como *Haematoloechus complexus* (Seely, 1906) por KRULL (1933). No Brasil, CARVALHO *et al.* (2001) encontraram estado de São Paulo este mesmo limneídeo albergando larvas também identificadas como *Haematoloechus* sp. Outras larvas semelhantes foram encontradas em moluscos planorbídeos na Argentina e identificadas como *Xiphidiocercaria* sp. II (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1974b) e *Xiphidiocercaria* sp. III (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1993). A ausência de informações moleculares para as espécies de *Haematoloechus* que ocorrem na América do Sul impossibilitaram o avanço na identificação específica desta cercária. De fato, apesar de 8 espécies deste gênero já terem sido reportadas infectando anfíbios neste subcontinente (FERNANDES e KOHN, 2014), os dados aqui obtidos representam as primeiras sequências moleculares para o gênero neste subcontinente. As análises moleculares envolvendo ambos os marcadores nucleares utilizados apontam que as cercárias encontradas em *P. columella* correspondem a uma espécie de *Haematoloechus* diferente das 9 espécies norte-americanas com dados disponíveis para comparação. Este achado apresenta um avanço em relação à identificação prévia realizada em nível de família (PINTO, 2013).

#### 5.2.2.2- *Magnivitellinum* sp. (Plagiorchioidea: Alloglossidiidae)

Localidade: Turiaçu, Maranhão, Brasil.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria glabrata*.

##### 5.2.2.2.1- Caracterização morfológica

Xifidiocercária com corpo oval e tegumento espinhoso (Figura 34). Ventosa oral grande, subterminal, muscular, com estrutura glandular que provavelmente corresponde a expansão dos canais das glândulas de penetração. Estilete pequeno, sem bulbo, com um par de “shoulders” na porção anterior. Ventosa ventral equatorial, menor que a ventosa oral. Pré-faringe curta, faringe muscular. Cecos não visualizados. Três pares de glândulas maiores localizadas lateralmente à ventosa ventral, e quatro pares de glândulas menores localizadas na porção pré-acetabular. Ambos os tipos de glândulas com canalículos direcionados para a região anterior da ventosa oral. Vesícula excretora em forma de Y. Cauda simples, menor que o corpo. As medidas das cercárias de *Magnivitellinum* sp. do presente estudo são apresentadas na Tabela 15.

##### 5.2.2.2.2- Estudo molecular

Um fragmento de 1232 pb do gene 28S foi obtido para esta cercária. Nas análises filogenéticas (Figura 38) verificou-se o agrupamento, com bom suporte, em um clado contendo *Magnivitellinum saltaensis* Davies *et al.*, 2021 recentemente descrita da Argentina (divergência nucleotídica: 0,3%) e *Magnivitellinum simplex* Kloss, 1966 do México (divergência nucleotídica: 1,3-1,6%) (Anexo 2: Tabela 15). Tentativa de obtenção de sequências ITS para este isolado foram realizadas, porém, sem sucesso.

##### 5.2.2.2.3- Comentários taxonômicos

A cercária de *Magnivitellinum* sp. encontrada em *B. glabrata* no presente estudo assemelha-se a *Cercaria minense* Ruiz, 1952, larva descrita na mesma espécie de planorbídeo no estado de Minas Gerais, Brasil (RUIZ, 1953). Outros autores brasileiros relataram *C. minense* ou xifidiocercárias do grupo Virgulata não identificadas, provavelmente congêneras com *Magnivitellinum* sp., em *Biomphalaria* spp. do Brasil

(MELO & PEREIRA 1985; SOUZA *et al.*, 1998, PINTO & MELO 2013b, SILVA & MELO 2013). A possibilidade dessas cercárias serem espécies diferentes de *Magnivitellinum* sp. não pode ser descartada. Três outras xifidiocercárias semelhantes foram descritas de *Biomphalaria* spp. na América do Sul. *Cercaria abdulhameedi* encontrada *B. straminea* na Venezuela (NASIR, 1982), tem morfologia geral semelhante às cercárias aqui caracterizadas, porém é maior e apresenta glândulas de penetração com arranjo diferente. Xiphidiocercaria sp. encontrada em *B. straminea* e *Biomphalaria orbigny* Paraense, 1975 na Argentina por OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.* (1990), também revela algumas similaridades, contudo possui medidas um pouco menores e apresenta cecos longos que quase atingem a extremidade posterior do corpo. Também na Argentina, *Cercaria xiphidiocerca* foi encontrada em *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) por MARTORELLI *et al.* (2013), apresentando medidas semelhantes às aqui apresentadas para *Magnivitellinum* sp., porém, apresenta cecos. DAVIES *et al.* (2021) descreveram recentemente o ciclo de uma nova espécie deste gênero na Argentina, *M. saltaensis*, que diferentemente da larva aqui registrada, possui esôfago longo e cecos intestinais. No Brasil, não existem até então, dados moleculares para as espécies de *Magnivitellinum*.



FIGURA 34- *Magnivitellinum* sp. Estágios de desenvolvimento encontrados *Biomphalaria glabrata* no estado do Maranhão. (a) Visão completa da cercária. (b) Detalhe do corpo. (c) Estilete. Escalas 50  $\mu$ m (a). 10  $\mu$ m (b, c).

TABELA 15- Dados morfométricos cercárias de *Magnivitellinum* sp. obtidas em *Biomphalaria glabrata* no estado do Maranhão, Brasil. Dados de larvas semelhantes reportadas na América Sul são apresentadas para comparação

Espécie		<i>Magnivitellinum</i> sp.	<i>Magnivitellinum</i> <i>saltaensis</i>	<i>Cercaria</i> <i>minense</i>	<i>Cercaria</i> <i>abduhameedi</i>	<i>Xiphidiocercaria</i> sp. I	<i>Cercaria</i> <i>xiphidiocerca</i>
Localidade		Brasil	Argentina	Brasil	Venezuela	Argentina	Argentina
Hospedeiro		<i>B. glabrata</i>	<i>B. tenagophila.</i>	<i>B. glabrata</i>	<i>B. straminea</i>	<i>B. straminea</i> <i>B.</i> <i>orbigny</i>	<i>B. tenagophila</i>
Referência		Presente estudo	DAVIES <i>et al.</i> (2021)	RUIZ (1953)	NASIR (1982)	OSTROWSKI DE NÚÑEZ <i>et al.</i> (1990)	MARTORELLI <i>et</i> <i>al.</i> (2013)
<b>Corpo</b>	C	168 ± 8 (152-180)	175 (152- 201)	185-215	198-234	187± 4 (180-190)	182 ± 18 (170-210)
	L	68 ± 5 (63-80)	68 (49-157)	98-123	93-109	86 ± 2 (82-90)	86 ± 9 (80-100)
<b>Cauda</b>	C	125 ± 6 (108-134)	164 ± 6 (149-181)	153	151-169	133 ± 7 (126-145)	111 ± 13 (100-125)
	L	22 ± 2 (19-26)	27 ± 3 (18-33)	-	21-73	24 ± 1 (23-25)	-
<b>Ventosa oral</b>	C	39 ± 3 (36-46)	43 (39-47)	50-63	52-57	43 ± 2 (40-48)	43 ± 3 (40-46)
	L	38 ± 2 (34-43)	40 (34-44)	-	52-57	45 ± 2 (42-48)	49 ± 4 (45-46)
<b>Ventosa ventral</b>	C	31 ± 2 (26-34)	32 (29- 34)	40-50	34-43	35 ± 1 (34-38)	38 ± 2 (35-40)
	L	31 ± 2 (29 36)	31 (27-34)	-	34-43	37 ± 3 (34-46)	42 ± 2 (40-45)
<b>Estilete</b>	C	17 ± 2 (14-19)	18 (17-20)	22	16-19	17 ± 1 (15-19)	-
	L	6 ± 1 (5-7)	6 (5-7)	-	6-8	-	-

### 5.2.2.3- Haematoloechidae gen. sp. (Plagiorchioidea: Haematoloechidae)

Localidade: Jacarepaguá, Rio de Janeiro/RJ.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria tenagophila*.

#### 5.2.2.3.1- Caracterização morfológica

Corpo com forma variável, dependendo do nível de distensão (Figura 35). Tegumento coberto de pequenos espinhos. Cauda mais ou menos do mesmo tamanho do corpo, sem membrana natatória. Ventosa oral subterminal, apresentando estilete relativamente grande, afilado. Ventosa ventral pouco desenvolvida, post-equatorial. Pré-faringe presente. Faringe muscular. Esôfago presente. Cecos intestinais não observados. As glândulas de penetração se apresentam em número de dez, cinco em cada lado da região acetabular. Células cistogênicas localizadas nas laterais da borda do corpo. Vesícula excretora em forma de “Y”, e os ramos desta, ultrapassam a borda anterior do acetábulo. As medidas das cercárias de Haematoloechidae gen. sp. do presente estudo são apresentadas na Tabela 16.

#### 5.2.2.3.2- Estudo molecular

Um fragmento de 1200 pb foi obtido para este isolado. Os resultados das análises do gene nuclear 28S (Figura 38) demonstraram que estas cercárias pertencem à família Haematoloechidae. Essa identificação é suportada pela formação de um clado bem suportado contendo representantes desta família utilizados nas análises. A espécie se apresenta como uma linhagem distinta destes, sendo verificadas divergências genéticas de 8,1-12%. A análise filogenética baseada em sequências ITS (Figura 39) também revelou a inclusão destas cercárias na família Haematoloechidae. Neste caso, foi verificado o agrupamento com *Skryabinoeces similis* da Ucrânia (AF316168), porém com uma diferença de 10,3%, o que sugere tratar-se de gêneros distintos. As divergências nucleotídicas em relação às outras espécies utilizadas para comparação, principalmente as pertencentes ao gênero *Haematoloechus*, foram de 10-16% (Anexo 2: Tabelas 15 e 16).

#### 5.2.2.3.3- Comentários taxonômicos

As cercárias aqui identificadas como Haematoloechidae gen. sp. são similares a *Cercaria lutzi*, larva descrita de *Biomphalaria* spp. no estado de São Paulo por RUIZ (1943). Posteriormente, larvas com essas características foram registradas nestes mesmos hospedeiros por outros autores no país (RUIZ, 1952a; SOUZA *et al.*, 1998a; MORAES *et al.*, 2009). Na Venezuela, OSTROWSKI DE NÚÑEZ (1982) descreveu uma larva semelhante encontrada em *B. glabrata*, denominada Xiphidiocercaria sp. I. Esta difere da larva aqui caracterizada pela presença de pelos sensoriais laterais e pelo formato da vesícula excretora. Adicionalmente, OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.* (1991) descreveram Xiphidiocercaria sp. V de *Biomphalaria occidentalis* na Argentina, que difere das encontradas no Brasil pela disposição dos tubos excretores principais, que não ultrapassam a ventosa ventral. A cercária aqui caracterizada pode ser facilmente diferenciada de larvas do gênero *Haematoloechus* pela ausência de membrana natatória na cauda. A escassez de dados moleculares para os representantes da família Haematoloechidae sul-americanos é um empecilho para o avanço na identificação. De qualquer forma, os dados moleculares confirmam a suposição de RUIZ (1943) de que *C. lutzi* poderia ser uma espécie desta família.

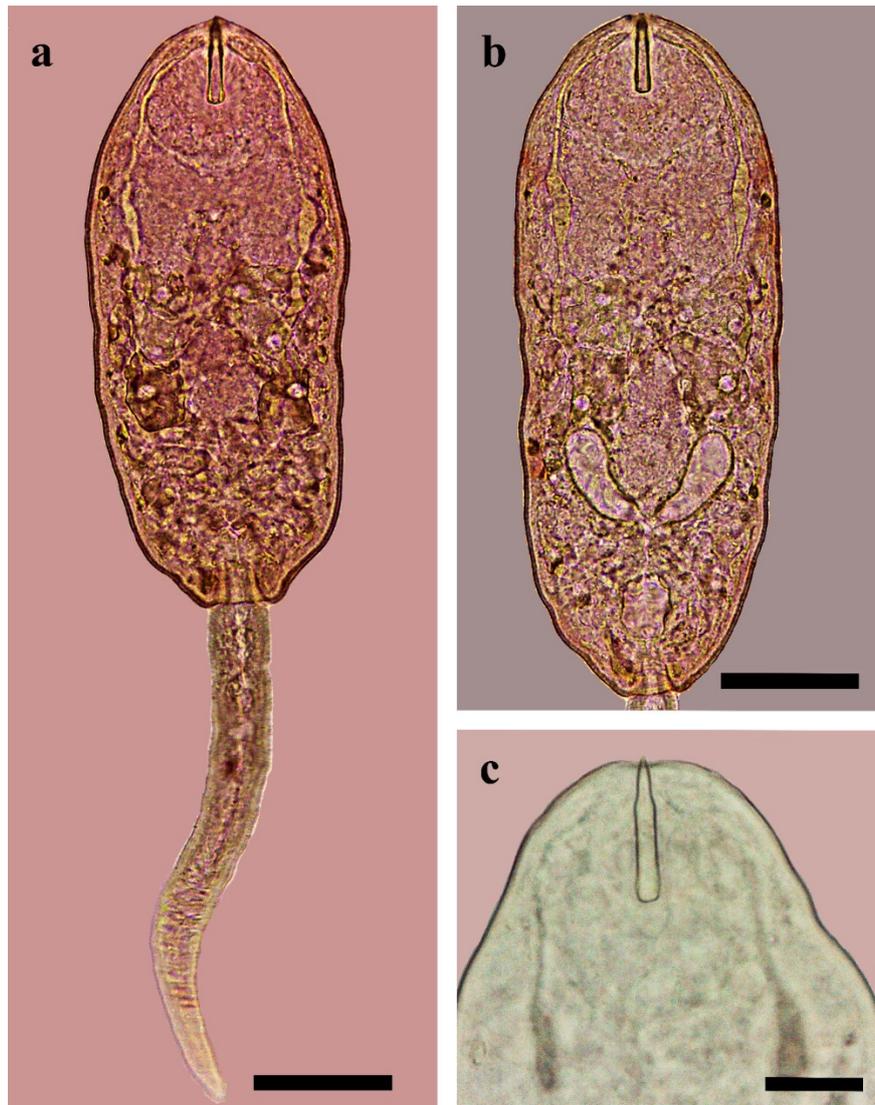


FIGURA 35- Haematolechidae gen. sp. (a) Cercária emergida de *Biomphalaria tenagophila* naturalmente infectada (b) Detalhe do corpo da cercária (c) Detalhe do estilete. Escalas: 50 µm (a, b). 20 µm (c).

TABELA 16- Dados morfométricos de cercárias de Haematoloechidae gen. sp. obtidas em *Biomphalaria tenagophila* no Rio de Janeiro, RJ, Brasil

		<b>Haematoloechidae gen. sp.</b>	<b><i>Cercaria lutzi</i></b>	<b><i>Xiphidioxercaria</i> sp. II</b>
<b>Localidade</b>		Brasil	Brasil	Venezuela
<b>Hospedeiro</b>		<i>B. tenagophila.</i>	<i>Biomphalaria</i> spp.	<i>B. glabrata</i>
<b>Referência</b>		Presente estudo	RUIZ (1952a)	OSTROWSKI DE NÚÑEZ (1982)
<b>Corpo</b>	C	175 ± 6 (162-188)	159-205	141-182
	L	93 ± 7 (79-107)	86-96	66-99
<b>Cauda</b>	C	164 ± 6 (149-181)	148-159	108-166
	L	27 ± 3(18-33)	-	25-33
<b>Ventosa oral</b>	C	40 ± 4 (33-53)	42-47	33-46
	L	42 ± 5(35-53)	-	27-46
<b>Ventosa ventral</b>	C	10 ± 2 (7-14)	16-20	15-17
	L	10 ± 2 (7-14)	-	15-17
<b>Estilete</b>	C	29 ± 3(19-35)	25	25-31
	L	4 ± 0,6(4-5)	-	4-6

#### 5.2.2.4- Plagiorchioidea gen. sp. (Plagiorchioidea)

Localidade: Jacarepaguá, Rio de Janeiro/RJ.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria tenagophila*.

##### 5.2.2.4.1- Caracterização morfológica

Corpo alongado, tegumento com pequenos espinhos (Figura 36). Cauda aproximadamente do mesmo tamanho do corpo, mais delgada na porção posterior. Ventosa oral arredondada, subterminal, com um estilete relativamente pequeno. Ventosa ventral localizada na região equatorial, aproximadamente do mesmo tamanho da ventosa oral. Pré-faringe curta. Faringe bem desenvolvida. Esôfago presente. Cecos intestinais não observados. Glândulas de penetração (6 a 8 pares) localizadas na região pré-acetabular, com canalículos que passam lateralmente a ventosa oral e se abrem na região anterior. As glândulas cistogênicas presentes, ovais, com conteúdo granular, posicionadas nas laterais do corpo, desde o nível da faringe até a região posterior. Vesícula excretora em “Y”. As medidas das cercárias de *Plagiorchioidea* gen. sp. do presente estudo são apresentadas na Tabela 17.

##### 5.2.2.4.2- Estudo molecular

Um fragmento de 1139 pb do gene 28S foi obtido para estas cercárias. A análise filogenética (Figura 38) demonstrou que o isolado avaliado neste estudo agrupa-se em um clado bem suportado com *Travtrema* Pereira, 1929 e *Urotrema* Braun, 1900, contudo, com divergências nucleotídicas bastante expressivas (11% e 12%, respectivamente). As divergências em relação a outras espécies da superfamília *Plagiorchioidea* usadas para comparação variaram entre 6,2% e 12,8%. A análise de sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 (Figura 39) não evidenciou agrupamento do isolado deste estudo com as espécies com sequências disponíveis para comparação. Comparando com os outros isolados da superfamília, as divergências foram de 6,8-11,8% (Anexo 2: Tabelas 15 e 16).

##### 5.2.2.4.3- Comentários taxonômicos

Esta cercária é semelhante a *Cercaria santense* descrita por RUIZ (1952a) a partir

larvas encontradas em *Biomphalaria* sp. no Brasil. Uma larva semelhante, identificada como *Xiphidiocercaria* sp. III, foi encontrada em *Biomphalaria prona* na Venezuela por OSTROWSKI DE NÚÑEZ (1982). Esta é maior que *Plagiorchioidea* gen. sp., apresenta estilete com bulbo basal e cauda é menor do que o corpo. Os dados moleculares apontam que se trata de um gênero de *Plagiorchioidea* ainda sem sequências disponíveis para comparação.

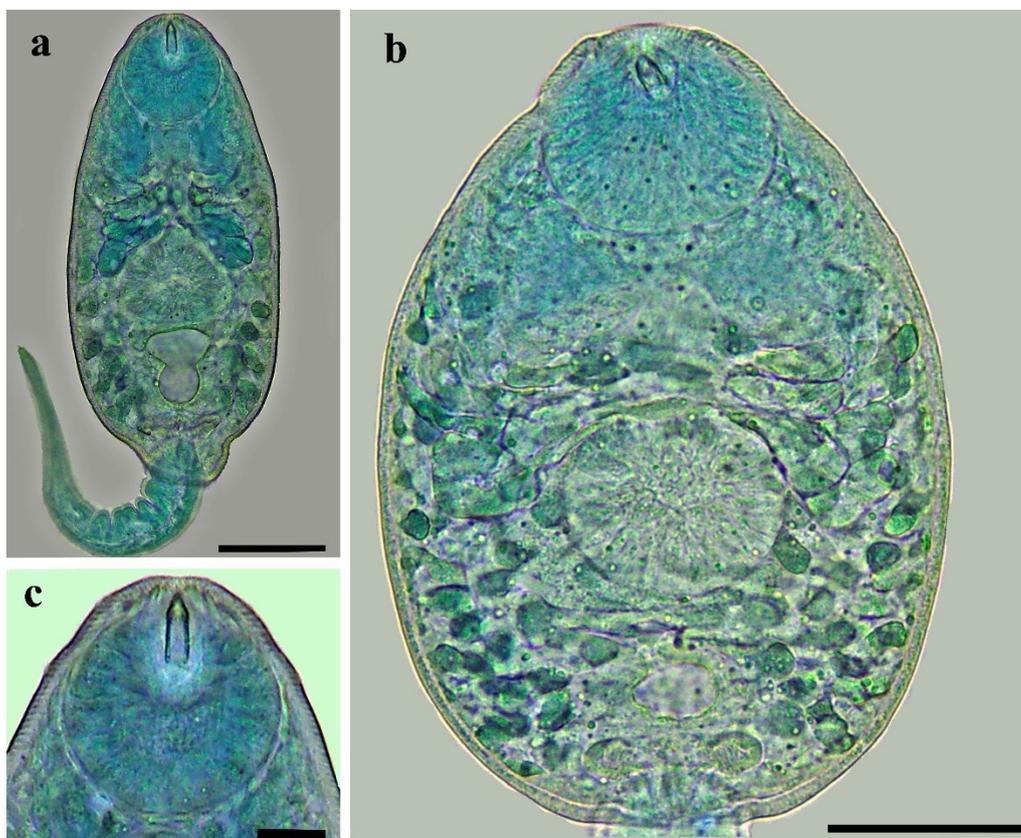


FIGURA 36- *Plagiorchioidea* gen. sp.: (a) Cercária emergida de *Biomphalaria tenagophila* naturalmente infectada (b) Detalhe do corpo da cercária. (c) Detalhe do estilete. Escalas: 50  $\mu\text{m}$ .

TABELA 17- Dados morfométricos de cercárias de Plagiorchioidea gen. sp. obtidas em *Biomphalaria tenagophila* no Rio de Janeiro, RJ, Brasil e de larvas semelhantes registradas na América do Sul

	<b>Plagiorchioidea gen. sp.</b>		<b><i>Cercaria santense</i></b>	<b>Xiphidiocercaria sp. III</b>
		Brasil	Brasil	Venezuela
<b>Localidade</b>				
<b>Hospedeiro</b>		<i>B. tenagophila</i>	<i>Biomphalaria</i> sp.	<i>B. prona</i>
<b>Referência</b>		Presente estudo	RUIZ (1952a)	OSTROWSKI DE NÚÑEZ <i>et al.</i> (1982)
<b>Corpo</b>	C	204 ± 14 (167-220)	216	215-282
	L	69 ± 20 (44-97)	98	83-108
<b>Cauda</b>	C	133 ± 16 (109-165)	-	174-207
	L	19 ± 3 (14-26)	-	25
<b>Ventosa oral</b>	C	42 ± 9 (25-53)	50	50-55
	L	40 ± 8 (21-53)	-	48-53
<b>Ventosa ventral</b>	C	39 ± 7 (35-56)	53	42-48
	L	39 ± 7 (30-53)	-	42-46
<b>Estilete</b>	C	29 ± 1 (28-30)	14	13-19
	L	4	5	4-5

#### 5.2.2.5- *Renifer* sp. (Plagiorchioidea: Reniferidae)

Localidade: Caeté, Minas Gerais, Brasil.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Stenophysa marmorata*.

##### 5.2.2.5.1- Caracterização morfológica

Corpo ovalado (Figura 37). Tegumento com pequenos espinhos. Cauda simples, sem membrana natatória, aproximadamente do mesmo tamanho do corpo. Ventosa oral subterminal, com um estilete na porção anterior, sem bulbo basal, relativamente pequeno e fino. Pré-faringe curta. Faringe muscular. Não foram observados o esôfago e os cecos intestinais. Ventosa ventral maior que a ventosa oral. As glândulas de penetração estão dispostas em dois grupos, um em cada lado do corpo, cada grupo constituído por 7 glândulas. Vesícula excretora em forma de “Y” com ramos que se estendem até a metade da região acetabular. As medidas das cercárias de *Renifer* sp. do presente estudo são apresentadas na tabela 18.

##### 5.2.2.5.2- Estudo molecular

A análise de sequências 28S (1164 pb) (Figura 38), revelou que a xifidiocercária aqui reportada se agrupa em um mesmo clado contendo representantes da família Reniferidae Pratt, 1902 (gêneros *Lechriorchis* Stafford, 1905, *Dasymetra* Nicoll, 1911 e *Renifer* Pratt, 1902). Quando comparada com outras espécies do gênero *Renifer* disponíveis no GenBank, *Renifer kansense* Crow, 1913 e *Renifer aniarum* Leidy, 1890, obtidos de serpentes da América do Norte, foram verificadas divergências moleculares de 1% e 1,8% respectivamente. As diferenças entre *Renifer* spp. e as duas outras espécies de Reniferidae incluídas nas análises, *Lechriorchis tigarty* Talbot, 1933 e *Dasymetra nicolli* Holl & Allison, 1935 foram 1,4% e 1,7%, respectivamente. Os resultados das análises com a região ITS1-5.8S-ITS2 (Figura 39) confirmaram os resultados obtidos por 28S. O isolado aqui caracterizado agrupou no mesmo clado com *R. aniarum*, *L. tigarty* e *Telorchis bonnerensis* Waitz, 1960, divergindo em 1,7%, 2% e 8,3%, respectivamente (Anexo 2: Tabelas 15 e 16).

Adicionalmente, foi obtida uma sequência do marcador mitocondrial *Cox-1* (região pós-barcode) (800 pb), porém só foi possível comparar com sequências disponíveis para

*Paralechriorchis syntomentera* (Sumwalt, 1926), única espécie da família Reniferidae com sequências disponíveis para comparação (Figura 40). As divergências moleculares em relação a esta espécie foram de 8,6-9,6%. Considerando-se outro membro da superfamília incluído nas análises, *Plagiorchis* sp., a diferença foi de 17% (Anexo 2: Tabela 17).

#### 5.2.2.5.3 Comentários taxonômicos

As larvas aqui caracterizadas se assemelham às descritas por BYRD (1935) como *Renifer aniarum*, encontradas em *Physella acuta* nos EUA. Contudo, o isolado brasileiro de *Renifer* sp. apresenta dois grupos de 7 glândulas de penetração, enquanto *R. aniarum* apresenta dois grupos de 9. No Brasil, apenas uma espécie deste gênero, *Renifer heterocoelium* (Travassos, 1921), foi relatada parasitando a cavidade oral de várias espécies de serpentes (FERNANDES & KONH, 2014). Anfíbios atuam como segundo hospedeiros intermediários (PINTO & MELO, 2012a). É provável que as cercárias de *Renifer* sp. pertençam a esta espécie, mas a ausência de sequências referências para *R. heterocoelium* impossibilitam esta associação. Os dados moleculares obtidos, além de suportar a identificação do gênero, parecem indicar que não há suporte filogenético para a manutenção dos gêneros *Lechriorchis* e *Dasymetra* como sendo distintos de *Renifer*, o que demanda estudos adicionais

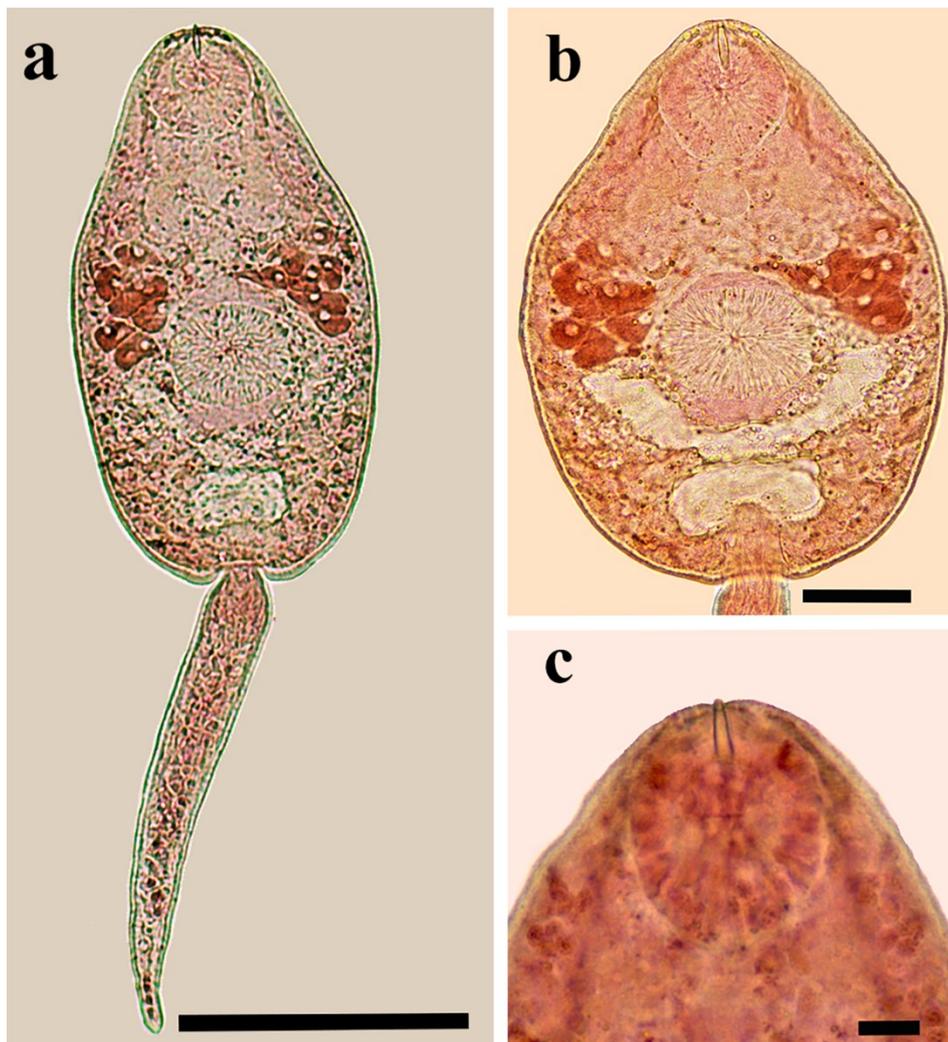


FIGURA 37- *Renifer* sp.: (a) Cercária emergida de *Stenophysa marmorata* naturalmente infectada coletada em Caeté, Minas Gerais (b) Detalhe do corpo da cercária. (c) Detalhe do estilete. Escalas: 200  $\mu\text{m}$  (a), 50  $\mu\text{m}$  (b,c).

TABELA 18- Dados morfométricos de cercárias de *Renifer* sp. de *Stenophysa marmorata* de Caeté, Minas Gerais, Brasil

Localidade		<i>Renifer</i> sp.	<i>Renifer aniarum</i>
		Brasil	EUA
Hospedeiro		<i>Stenophysa marmorata</i>	<i>Physella acuta</i>
Referência		Presente estudo	BYRD (1935)
<b>Corpo</b>	C	268 ± 24 (206-309)	182
	L	105 ± 19 (102-137)	135
<b>Cauda</b>	C	253 ± 24 (206-288)	38
	L	36 ± 3 (34-41)	45
<b>Ventosa oral</b>	C	56 ± 9 (36-74)	54
	L	51 ± 8 (34-69)	50
<b>Ventosa ventral</b>	C	60 ± 14 (43-103)	66
	L	20 ± 5 (15-34)	57
<b>Estilete</b>	C	21 ± 3 (17-25)	21
	L	4 ± 1 (3-6)	5

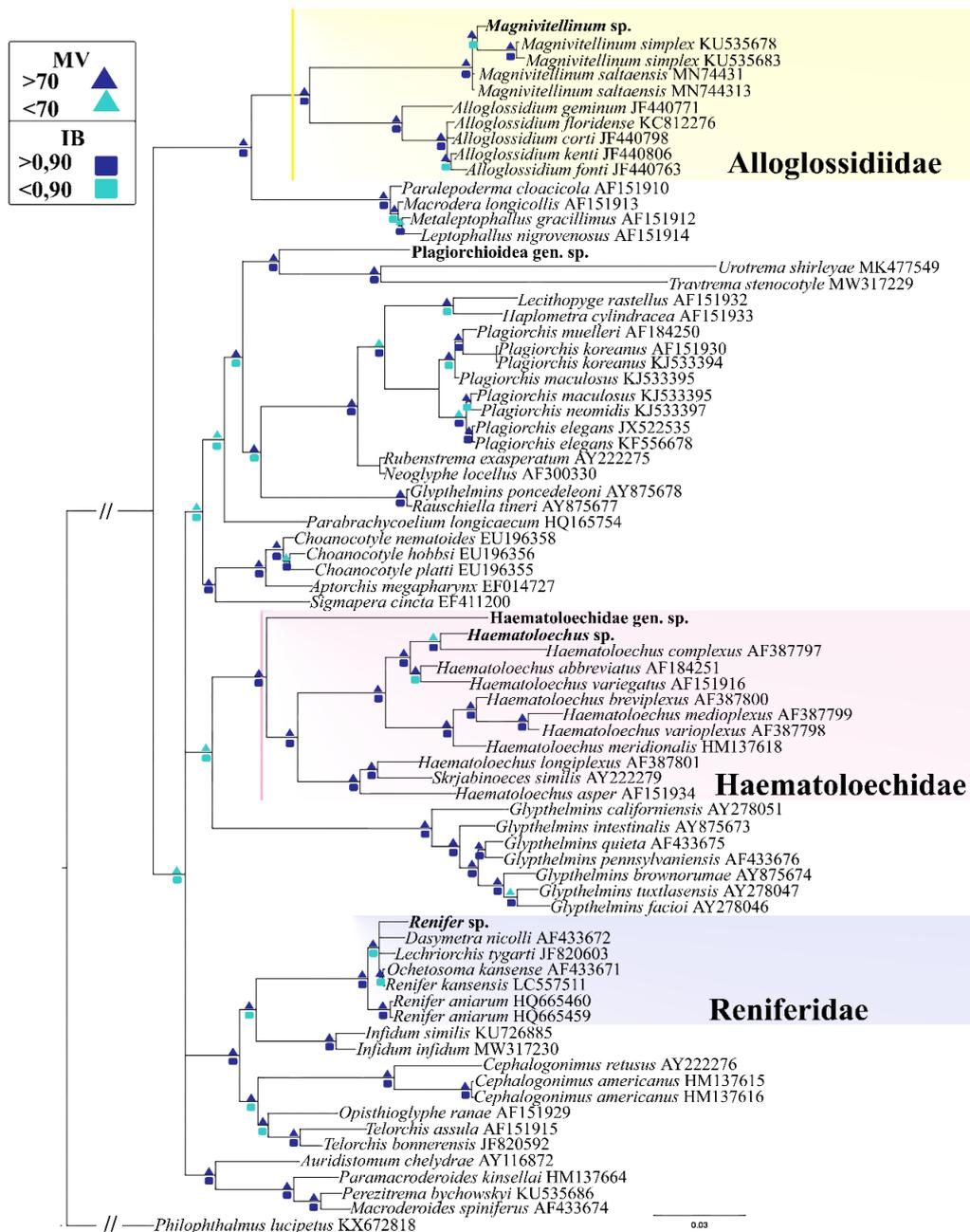


FIGURA 38- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região 28S para as amostras de *Haematoloechus* sp., *Magnivittellinum* sp., *Haematoloechidae* gen. sp, *Plagiorchioidea* gen. sp. e *Renifer* sp. (em negrito) e outras espécies de *Plagiorchioidea* com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo GTR+G+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (□) e bootstrap (△), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Philophthalmus lucipetus* foi usado como grupo externo.

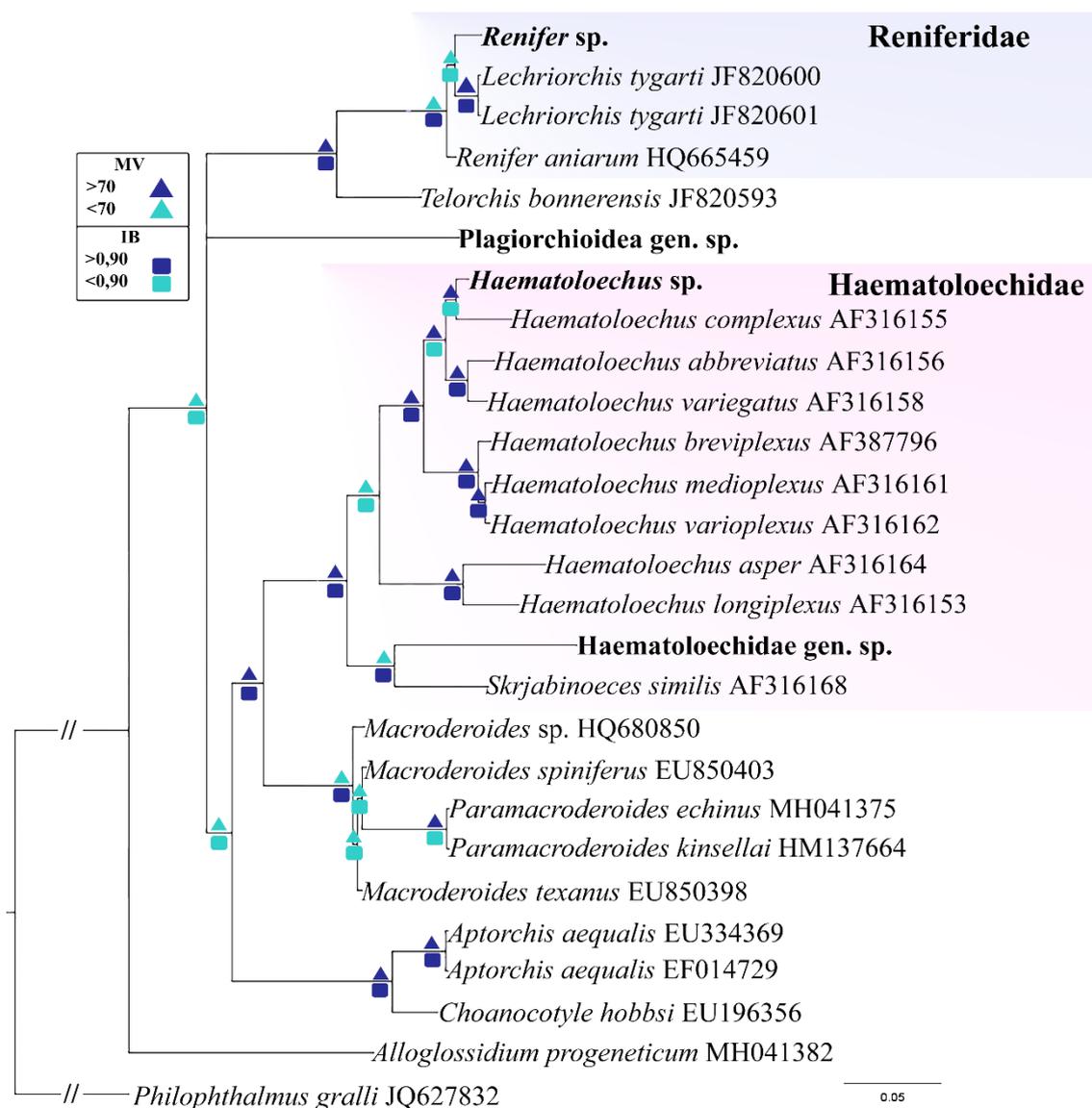


FIGURA 39- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região transcrita interna ITS1-5.8S-ITS2 para as amostras de *Haematoloechus* sp., *Haematoloechidae* gen. sp. *Plagiorchioidea* gen. sp. e *Renifer* sp. (em negrito) e outras espécies de *Plagiorchioidea* com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo GTR+G. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Philophthalmus gralli* foi usado como grupo externo.

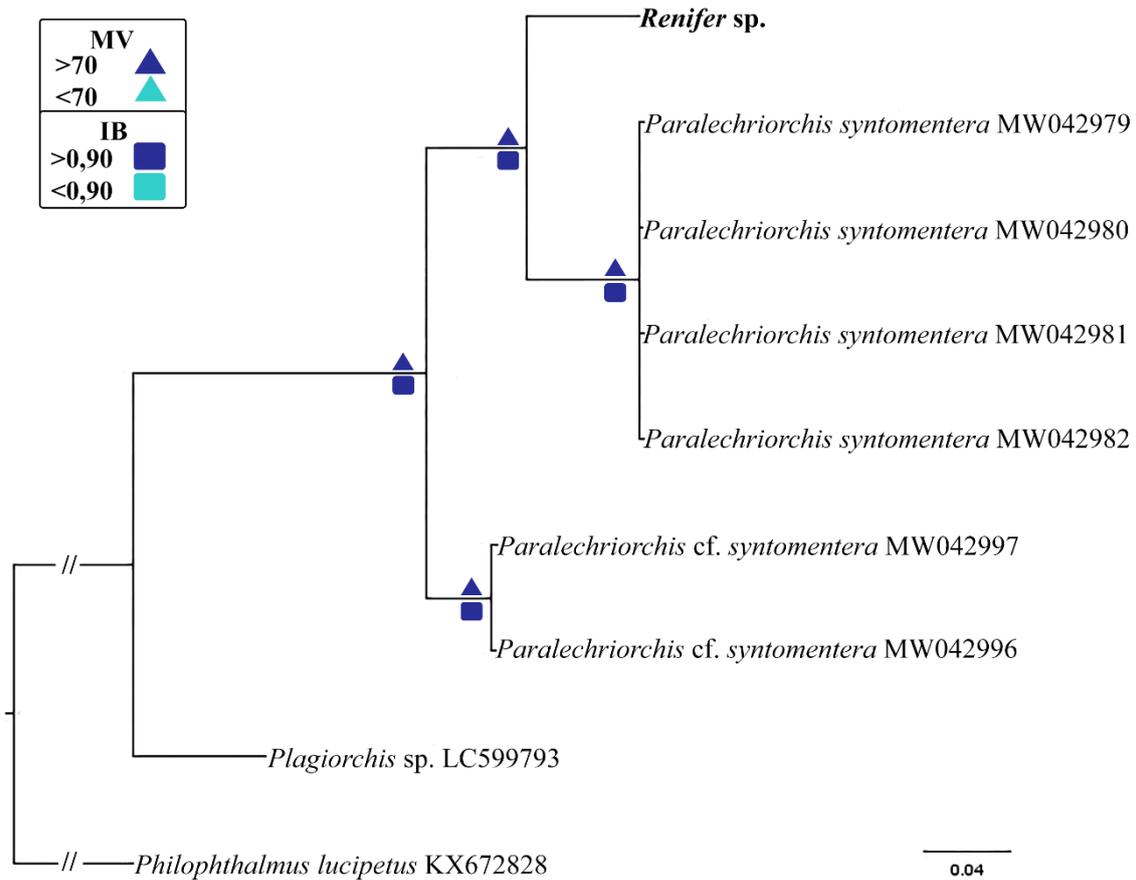


FIGURA 40- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene mitocondrial citocromo C oxidase *Cox-I* (Região pós-barcode) para as amostras de *Renifer sp.* (em negrito) e outras espécies de Plagiorchioidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+G. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Philophthalmus lucipetus* foi usado como grupo externo.

### 5.2.3 Discussão

Nas últimas décadas, um incremento progressivo na produção de dados moleculares para espécies representantes da superfamília Plagiorchioidea tem sido verificado (TKACH *et al.*, 2001; ENABULELE *et al.*, 2018; SCHWELM *et al.*, 2020; SHCHENKOV *et al.*, 2020;). Contudo, considerando estágios larvais, muitas dessas identificações foram realizadas em nível de família ou gêneros (SHCHENKOV *et al.*, 2020; SCHWELM *et al.*, 2020), reflexo da escassez de estudos envolvendo a geração de dados moleculares para as espécies do grupo. No Brasil, o panorama é ainda mais precário, tendo em conta que sequências referências para representantes desta superfamília são limitadas a dados recentes obtidos para *Infidum infidum* Faria, 1910 (Dicrocoeliidae) e *Travtrema stenocotyle* (Cohn, 1902) (Plagiorchiidae) (MÜLLER *et al.*, 2021). Apesar dos esforços realizados para a elucidação experimental de ciclos de vida de trematódeos nos últimos anos no país, estudos envolvendo espécies de Plagiorchioidea são escassos. Essa lacuna no conhecimento está relacionada principalmente à complexidade dos ciclos biológicos verificada neste grupo, difícil de ser estabelecido em laboratório. Nesse sentido, a contribuição da biologia molecular para a elucidação de novas interações biológicas entre esses parasitos e seus hospedeiros se torna promissora. As informações obtidas a partir de estágios larvais permitem a realização de inferências sobre os possíveis hospedeiros que participam nos ciclos biológicos deste grupo de trematódeos.

Do total de larvas encontradas no presente estudo, cinco xifidiocercárias foram identificadas como pertencentes à superfamília Plagiorchioidea. Estas larvas foram encontradas em moluscos dos gêneros *Biomphalaria*, *Stenophysa*, *Pseudosuccinea* e *Pomacea* nos estados do Maranhão, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Entre as xifidiocercárias encontradas em Minas Gerais, especificamente na Lagoa da Pampulha, identificou-se a infecção de *P. columela* por *Haematoloechus* sp. A identificação prévia deste cercária em nível de família foi realizada através de análises morfológicas e estudos experimentais realizados por PINTO (2013). No presente estudo, a identificação em nível genérico do mesmo isolado foi possível diante dos resultados das análises filogenéticas.

Os membros da família Haematoloechidae são parasitos de anfíbios anuros com ampla distribuição mundial (TKACH, 2008). Se caracterizam por apresentar poro genital mediano, (entre a faringe e o esôfago) e vitelária em forma de rosetas ou cachos (TKACH, 2008). A primeira espécie foi descrita no início do século XIX, sendo originalmente

denominada *Distomum variegatum* Rudolphi, 1819, a qual foi transferida para o gênero *Haematoloechus* por LOOSS (1899). Atualmente, são reconhecidas como válidas 70 espécies, sendo 8 delas, relatadas na América do Sul (LEÓN-RÉGAGNON & TOPAN, 2018). O ciclo biológico foi elucidado para algumas espécies, e envolve moluscos Lymnaeidae e Planorbidae (GRABDA, 1960; DRONEN, 1975) como primeiros hospedeiros intermediários, sendo metacercárias encontradas em larvas de insetos das ordens Odonata e Diptera (SNYDER & JANOVY, 1994; CARVALHO *et al.*, 2002; BOLEK *et al.*, 2010). Nos EUA, o envolvimento de *P. columella* na transmissão de *H. complexus* (Seely, 1906) foi reportado (KRULL, 1933). No Brasil, apenas duas espécies deste gênero foram relatadas até o momento: *H. freitasi* Mañé-Garzón & Gil, 1959 e *H. fuelleborni* (Travassos e Darriba, 1930), ambas encontradas em de *Leptodactylus latrans* (revisado por FERNANDES & KONH, 2014). Os ciclos biológicos destas espécies são ainda desconhecidos.

A análise de 28S revelou que as larvas de *Haematoloechus* sp. deste estudo agruparam em um mesmo clado com *H. complexus* dos Estados Unidos (SNYDER & TKACH, 2001), porém, com uma diferença de 3%. Uma outra espécie, *Haematoloechus abbreviatus* (Bychowsky, 1932), encontrada na Ucrânia (TKACH *et al.*, 2001) foi a que apresentou menor divergência molecular (2,2%) em relação a espécie do Brasil, agrupando-se, contudo, em outro clado. Da mesma maneira, a análise e sequências ITS confirmou a identificação do isolado do presente estudo como pertencente ao gênero *Haematoloechus*. Com este último marcador foi possível evidenciar divergências maiores em relação às espécies do gênero disponíveis para comparação (6-6,5%). A obtenção de sequências do estágio adulto deste parasito se faz necessário para a identificação específica. Além disso, a possibilidade de se tratar de uma nova espécie de parasito pulmonar de anfíbios não pode ser descartada.

Os resultados obtidos na análise de 28S no presente estudo permitiram associar uma xifidiocercária encontrada em *B. glabrata* a trematódeos do gênero *Magnivitellinum* Kloss, 1966. Morfologicamente, a cercária aqui caracterizada é indistinguível de *Cercaria minense*, descrita de *B. glabrata* no Brasil por RUIZ (1953) e registrada por diversos autores. Larvas semelhantes foram encontradas na Argentina e Venezuela (NASIR, 1982; OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.*, 1990). No presente estudo, a larva obtida de *B. glabrata* agrupou-se no mesmo clado com isolados de *Magnivitellinum simplex* do México (HERNÁNDEZ-MENA *et al.*, 2016) e *Magnivitellinum saltaensis* da Argentina (DAVIES *et al.*, 2021). Contudo as divergências moleculares obtidas indicam

tratar-se de outra espécie.

Os trematódeos do gênero *Magnivitellinum* infectam peixes de água doce da região neotropical (FONT & LOTZ, 2008). Por muito tempo este gênero esteve inserido na família Macroderoididae McMullen, 1937. Contudo, análises filogenéticas levaram a criação da família Alloglossidiidae para incluir os gêneros *Magnivitellinum* e *Alloglossidium* Simer, 1929 (HERNÁNDEZ-MENA *et al.* 2016). Atualmente no Brasil são conhecidas duas espécies: *Magnivitellinum simplex* Kloss, 1966, descrita de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) e reportada em outros peixes caraciformes e cipriniformes, e *M. corvitellinum* Lacerda, Takemoto, e Pavanelli, 2009, descrita de *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) e *Roeboides paranensis* Pignalberi, 1975. Tanto *M. simplex* quanto *M. corvitellinum* foram originalmente descritas na Bacia do Paraná, Brasil (KLOSS, 1966; LACERDA *et al.*, 2009; KOHN *et al.*, 2011), mas ainda não possuem ciclo biológico conhecido. Recentemente, DAVIES *et al.* (2021) descreveram através de análises morfológicas e moleculares o ciclo de uma nova espécie denominada *Magnivitellinum saltaensis*. Apesar da baixa divergência molecular no 28S entre estes isolados sul-americanos de *Magnivitellinum*, a presença ou não de cecos é uma diferença morfológica que sugere tratar-se de espécies distintas. É possível que a cercária em estudo pertença à outra espécie relatada para o gênero, *M. corvitellinum*. Os dados moleculares obtidos neste estudo representam a primeira sequência para o gênero *Magnivitellinum* gerada no Brasil.

Desde a descrição de *Cercaria lutzi*, uma xifidiocercária encontrada RUIZ (1952) em *B. tenagophila* e *B. glabrata* no estado de São Paulo, várias larvas semelhantes foram relatadas no Brasil e em outros países da América do Sul (OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.*, 1974; HAMANN *et al.*, 1993; CARVALHO *et al.*, 2001; MORAES *et al.*, 2009). Os dados moleculares obtidos demonstraram que este parasito pertence à família Haematoloechidae, a qual inclui atualmente quatro gêneros: *Haematoloechus* Looss, 1899, *Metahaematoloechus* Yamaguti, 1971, *Skrjabinoeces* Sudarikiov, 1950 e *Neohaematoloechus* Odening, 1960. Este último gênero, é caracterizado pela presença de cecos intestinais longos, alças uterinas extracecais e ausência de ventosa ventral. *Neohaematoloechus* está intimamente relacionado ao gênero *Haematoloechus*, diferenciando-se na presença de uma ventosa ventral neste último e sua ausência no primeiro. É interessante mencionar que RUIZ (1952a), sem nenhuma evidência experimental sugeriu que *C. lutzi* corresponderia a larvas de *Neohaematoloechus neivai* (Travassos & Artigas, 1927). As análises moleculares deste estudo revelaram

agrupamento da larva em estudo com sequências dos gêneros *Haematoloechus* e *Skrjabinoeces*, contudo, como uma linhagem independente. Nesse sentido, há fortes evidências de que se trata de um parasito pulmonar de anfíbios e ainda, a possibilidade de ser um representante do gênero *Neohaematoloechus* Odening, 1960, como sugerido por RUIZ (1952a), não pode ser descartada. Este gênero foi descrito em rãs na América do Sul e possui como espécie tipo *N. neivai*. No Brasil, duas espécies do gênero *Neohaematoloechus* foram relatadas: *N. iturbei* (Cordero e Vodgsang, 1939) de *Leptodactylus pipiens* e *N. neivai* (Travassos e Artigas, 1927) de *L. labyrinthicus* (revisado por FERNANDES & KONH, 2014). Assim, a obtenção de sequências moleculares das espécies listadas acima é necessária para o avanço na identificação desta cercária.

Outra xifidiocercária encontrada em *B. tenagophila* no estado do Rio de Janeiro é morfologicamente indistinguível de *Cercaria santense* descrita por RUIZ (1953). Outros relatos de larvas similares foram feitos na Venezuela (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1982). A partir da análise das sequências 28S evidenciou-se o agrupamento desta espécie com dois representantes dos gêneros *Travtrema* (parasitos de serpentes) e *Urotrema* (parasitos de quirópteros), mas com divergências nucleotídicas significativas. Já a análise com sequências ITS1-5.8S-ITS2 não revelou agrupamento com nenhuma das sequências disponíveis para comparação. Assim, essas larvas provisoriamente identificadas como Plagioichioidea gen. sp. correspondem a uma família de trematódeo com nenhum representante avaliado molecularmente. Entre as possibilidades, encontra-se a família Opisthogonimidae, parasitos de serpentes neotropicais ainda não sequenciados. A possibilidade de se tratar de uma nova família de trematódeos também não pode ser descartada. Apenas estudos futuros poderão desvendar a identidade deste parasito.

A quinta xifidiocercária identificada no presente estudo foi encontrada em *Stenophysa marmorata* em Caeté, Minas Gerais, e identificada como pertencente à família Reniferidae Pratt, 1902 e ao gênero *Renifer* Pratt, 1902. Estes trematódeos são encontrados na cavidade oral e esôfago de serpentes das regiões neártica e neotropical, com 9 espécies consideradas válidas (DUBOIS & MAHON, 1959; TKACH, 2008). Estão entre os trematódeos mais frequentemente encontrados em serpentes nas Américas, já tendo sido reportado em diferentes países, inclusive no Brasil (THATCHER, 1963; YAMAGUTI, 1971; DETTERLINE *et al.*, 1984; 1993; SILVA *et al.*, 1999). É importante mencionar que estes parasitos eram incluídos no gênero *Ochetosoma* e na família Ochetosomatidae. Contudo, uma homonímia foi detectada com *Ochetosoma* Ruppel &

Leuckart, 1828 (Filo Echiura) sendo por isso a validade do gênero *Renifer* Pratt, 1902 e da família Reniferidae Pratt, 1902 reestabelecidos (TKACH, 2008).

O ciclo biológico, conhecido para apenas uma espécie norte-americana (*Renifer aniarum* Leidy, 1891), envolve moluscos da família Physidae, nos quais são formadas xifidiocercárias que após emergirem se desenvolvem em metacercárias em peixes ou anfíbios (BYRD, 1935; PINTO & MELO, 2012a). As análises moleculares deste estudo, demonstraram que o isolado do presente estudo pertence ao gênero *Renifer*. É provável que corresponda a *R. heterocoelium*, espécie cujos adultos já foram encontrados em serpentes e metacercárias em anfíbios do estado de Minas Gerais (PINTO & MELO, 2012a; PINTO *et al.*, 2012b). Este é o primeiro relato de *S. marmorta* como primeiro hospedeiro intermediário de trematódeos do gênero *Renifer*. A futura obtenção de sequências moleculares de *R. heterocoelium*, única espécie descrita na América do Sul, poderá resultar na identificação específica destas xifidiocercárias.

### 5.3- CAPÍTULO 3: Larvas de trematódeos da superfamília Diplostomoidea em moluscos do Brasil

#### 5.3.1- Revisão da literatura

Os membros da superfamília Diplostomoidea Poirier, 1886 são parasitos de aves, mamíferos e répteis com distribuição cosmopolita. Existem aproximadamente 250 espécies atualmente alocadas em 6 famílias: Cyathocotylidae Mühlhling, 1898, Brauninidae Wolffügel, 1903, Bolbocephalodidae Strand, 1935, Diplostomidae Poirier, 1886, Protodiplostomidae Dubois, 1936 e Strigeidae Railliet, 1919 (NIEWIADOMSKA, 2002; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017). A presença de uma estrutura semelhante a uma ventosa, localizado ventralmente na linha mediana do corpo denominada órgão tribocítico, é uma característica diferencial deste grupo. Esta estrutura, que apresenta funções tanto adesiva quanto digestiva, possui glândulas proteolíticas que segundo alguns autores, estão associadas a digestão de células epiteliais da mucosa intestinal do hospedeiro (DAWES, 1968; TIESZEN *et al.*, 1974; NIEWIADOMSKA, 2002). Este grupo possui importância médica, sendo casos humanos da infecção por *Alaria* spp. devido ao consumo de hospedeiros intermediários e paratênicos infectados, relatados na Europa (FREEMAN *et al.*, 1976; FERNANDES *et al.*, 1976; MÖHL *et al.*, 2009; PORTIER *et al.*, 2011). Do ponto de vista veterinário, pode-se considerar que a maior importância destes parasitos é decorrente da participação de peixes como segundo-hospedeiros intermediários de algumas espécies. De fato, alguns representantes dos gêneros *Crassiphiala*, *Hysteromorpha*, *Posthodiplostomum*, *Ornithodiplostomum*, e *Uvulifer*, estão envolvidas na ocorrência da “Doença dos pontos pretos” (LANE & MORRIS, 2000; NIEWIADOMSKA, 2002). Além disso, metacercárias de espécies de alguns gêneros como *Diplostomum*, *Austrodiplostomum*, *Tylodelphys*, dentre outros, realizam o parasitismo ocular, causando cegueira e atraso de desenvolvimento de peixes (LANE & MORRIS, 2000; THATCHER, 2006; LIMA *et al.*, 2019; RUEHLE & POULIN, 2020; CHARO-KARISA *et al.*, 2021).

O ciclo de vida dos representantes da superfamília Diplostomoidea é muito complexo, podendo envolver até 4 hospedeiros. Na maioria das espécies é verificado o envolvimento de um gastrópode de água doce, no qual ocorre a fase de reprodução assexuada que culmina na produção de cercárias. Estas, após emergirem, precisam encontrar 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, 2002). A transmissão ao hospedeiro definitivo ocorre após a ingestão do segundo hospedeiro intermediário infectados, sendo o desenvolvimento dos vermes adultos verificado no trato intestinal (HORÁK *et al.*, 2014; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017).

O tipo cercariano verificado nesta superfamília são as larvas do tipo Longifurcada. A morfologia é variável, sendo alguns parâmetros morfológicos, como a disposição das glândulas de penetração, espinhos do tegumento, número e distribuição de cerdas, fórmula do sistema excretor, podem algumas vezes auxiliar na identificação de famílias e gêneros (DAWES, 1968; DUBOIS, 1970; NIEWIADOMSKA, 2002). No caso das metacercárias, fase larval encontrada no segundo hospedeiro intermediário, a morfologia é variada, podendo ser denominadas de *Diplostomulum* Brandes, 1892, *Tetracotyle* De Fillipi, 1895, *Neascus* Hughes, 1927, *Prohemistomulum* Ciurea, 1933 e *Neodiplostomulum* Dubois, 1938 (NIEWIADOMSKA, 2002). Estes diferentes morfotipos de metacercárias se localizam em diferentes órgãos dos hospedeiros intermediários, dependendo da espécie de parasito.

Na América do Sul, mais de 110 espécies de 6 famílias já foram descritas em aves, mamíferos e répteis (compilado por FERNANDES e KOHN, 2014; FERNANDES *et al.*, 2015). Destas, 65 já foram relatadas em diferentes espécies de vertebrados no Brasil (COHEN *et al.*, 2022). Com relação aos estágios larvais em moluscos, na América do Sul já foram descritas cerca de 70 larvas identificadas como pertencentes à gêneros de grupo coletivo (*Cercaria* Muller, 1774 e *Furcocercaria* Lamarck, 1815) ou identificadas até nível de família. Deste total, 26 foram descritas no Brasil. Além disso, a implementação de estudos experimentais possibilitou elucidação do ciclo biológico de 11 espécies na América do Sul (revisado por LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2018). Atualmente, com o uso da taxonomia integrativa, um total de 138 sequências existentes para 23 espécies de Diplostomoidea (isolados de vertebrados - parasitos em estágio adulto ou metacercárias) foram obtidas na América do Sul (GARCIA-VARELA *et al.*, 2015; LOCKE *et al.*, 2015; 2018; BLASCO-COSTA e LOCKE, 2017; ACHATZ *et al.*, 2019; PELEGRINI *et al.*, 2019; QUEIROZ *et al.*, 2019; SERENO-URIBE *et al.*, 2019; TKACH *et al.*, 2020). Estes dados indicam que a maior parte dos ciclos biológicos e moluscos transmissores destes parasitos permanecem ainda desconhecidos neste continente. Apesar disso, nos últimos tempos, alguns avanços foram verificados pelo nosso grupo de pesquisa no estudo molecular de cercárias e metacercárias de alguns representantes desta superfamília no

Brasil (LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2018, 2019; QUEIROZ *et al.*, 2019; LOCKE *et al.*, 2021).

### 5.3.2- Resultados

Três morfotipos de cercárias pertencentes à superfamília Diplostomoidea provenientes de Belo Horizonte, Contagem, Januária, Minas Gerais, Brasil, foram avaliadas neste estudo. As cercárias foram encontradas infectando moluscos planorbídeos dos gêneros *Biomphalaria* e *Drepanotrema*. Adicionalmente, dados moleculares obtidos para metacercárias encontrada encistadas em peixes ornamentais, *Etroplus maculatus* (Bloch, 1795), de um criatório da região metropolitana de Belo Horizonte, foram também obtidos e comparadas com as cercárias. As larvas analisadas foram identificadas até o menor nível taxonômico possível e os resultados obtidos são apresentados abaixo.

#### 5.3.2.1- *Crassiphiala* sp. (Diplostomoidea: Diplostomidae)

Localidade: Belo Horizonte, Brasil.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria straminea*.

Segundo hospedeiro intermediário: *Etroplus maculatus*.

##### 5.3.2.1.1- Caracterização morfológica

*Cercária*: a caracterização morfológica desta larva do tipo Monostoma Longifurcada Faringeada foi previamente realizada por LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.* (2018), sendo à época identificada como *Crassiphialinae* gen. sp.

*Metacercária* (Figura 41): cistos encontrados no tegumento e nadadeiras envolvidos por reação do hospedeiro, com deposição de melanina produzida por melanomacrófagos, resultando em manchas pretas medindo cerca de 0,5 mm. Morfologicamente os cistos são pequenos, com formato de oval a esférico medindo  $337 \pm 19$  (310-366) x  $339 \pm 27$  (295-383). Parede cística resistente,  $33 \pm 8$  (26-47) de espessura, contendo um cisto interno oval,  $218 \pm 6$  (212-224) por  $158 \pm 1$  (156-160), com uma membrana fina. As larvas desensistadas são muito pequenas, do tipo *Neascus*, com corpo bipartido,  $409 \pm 71$  (303-454) por  $149 \pm 12$  (135-163) (Figura 40 b). Segmento anterior alongado-oval,  $216 \pm 37$

(163-245) × 101 ± 16 (89-125). Segmento posterior oval, 194 ± 35 (141-219) × 149 ± 12 (135-163). Ventosa oral subterminal, oval, 36±3 (32-38) × 36±5 (29-41). Faringe muscular, esférica, 25 ± 3 (22-28) x 26 ± 2 (24-29). Órgão tribocítico oval, ocupando 50% do segmento anterior.

#### 5.3.2.1.2- *Estudo molecular*

Na análise filogenética baseada nos genes nucleares 28S e ITS1-5.8S-ITS2, foram obtidas sequências nucleotídicas de 1227 pb (28S) e 1200 pb (ITS). Os alinhamentos finais continham 1227 pb e 1039 pb, respectivamente. Verificou-se com ambos os marcadores o agrupamento do parasito em clados bem suportados contendo *Crassiphiala* spp. Na análise de sequências 28S (Figura 42), não foram encontradas divergências nucleotídicas em relação a um isolado previamente identificado como *Crassiphiala* sp. linhagem 5 (MN200261), recuperado de martim-pescador, *Megaceryle torquata*, do Pantanal brasileiro (ACHATZ *et al.*, 2019). Já na análise de sequências ITS (Figuras 43), também não foram verificadas divergências entre cercárias previamente encontradas em *Biomphalaria straminea* em Belo Horizonte (MN179277) e as metacercárias sequenciadas para este estudo (Anexo 2: Tabelas 18 e 19).

A análise do gene mitocondrial *Cox-1* resultou em um alinhamento contendo 372 pb, que incluiu duas espécies/linhagens do gênero *Crassiphiala*. Além disso, novas sequências foram obtidas para a mesma região do gene *Cox-1* da cercária previamente encontrada em *B. straminea* da mesma área geográfica (LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Não foram encontradas divergências nucleotídicas entre estes diferentes estágios larvais oriundos de peixes e moluscos, indicando coespecificidade. Na análise filogenética (Figura 44), ambos isolados foram incluídos no mesmo clado com *Crassiphiala* sp. linhagem 5 estudada por ACHATZ *et al.*, (2019). Uma baixa divergência (1,5-2,3%) foi verificada entre estes isolados brasileiros, indicando tratar-se de uma mesma espécie do gênero *Crassiphiala*. Por outro lado, a espécie difere de *Crassiphiala* sp. linhagem 2 em 6,4-7,4%. Além disso, a comparação das sequências de *Cox-1* da região barcode (previamente caracterizada para cercárias de *B. straminea* -MN179323) também confirma a relação com *Crassiphiala* sp. linhagem 5 (3-7,4% de divergência com os isolados de *M. torquata*). As divergências nucleotídicas em relação a outras três linhagens de *Crassiphiala* dos EUA bem como de *Crassiphiala* lineage 4 também do Brasil, foram maiores (12,3-17,3%, respectivamente) (Anexo 2: Tabelas 20 e 21).

### 5.3.2.1.3- Comentários taxonômicos

Estudos referentes à identificação de moluscos e peixes na transmissão de espécies de gênero *Crassiphiala* Van Haitsma, 1925 são escassos. Os resultados obtidos representam a primeira identificação deste gênero em hospedeiros intermediários na América do Sul. Além disso, associação com uma das espécies recentemente reportadas em aves no país (ACHATZ *et al.*, 2019) foi possível mediante as análises moleculares. As cercárias previamente identificadas como Crassiphialinae gen. sp. por LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.* (2019) são agora associadas a este gênero.

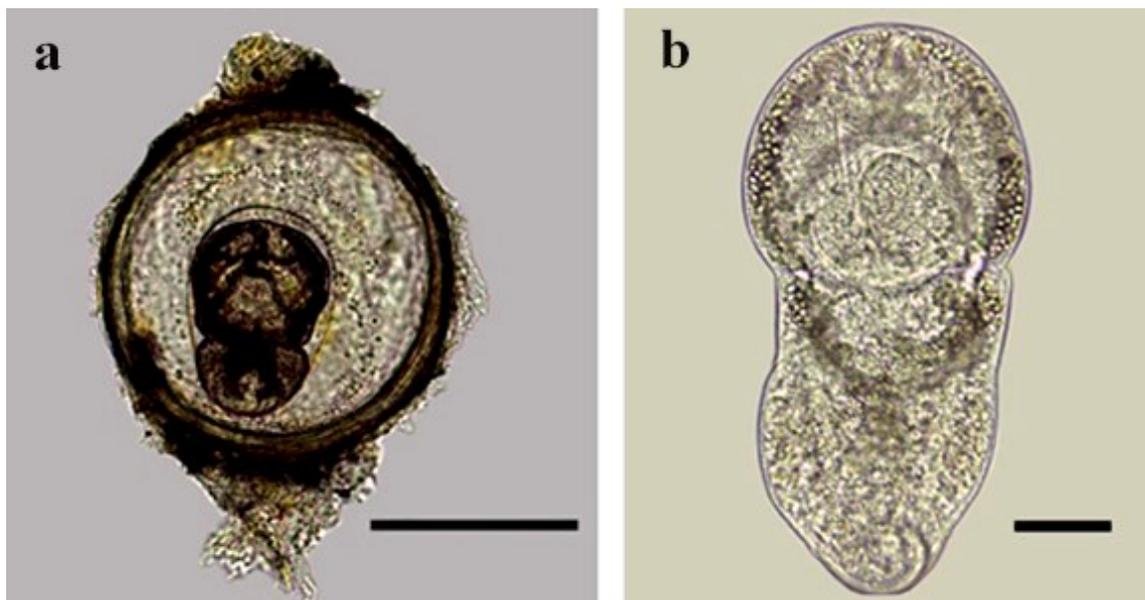


FIGURA 41- *Crassiphiala* sp. (a) Metacercária encistada encontrada em *Etroplus maculatus*. (b) Metacercária do tipo *Neascus* desencistada. Escalas: 200  $\mu$ m (a), 50  $\mu$ m (b).

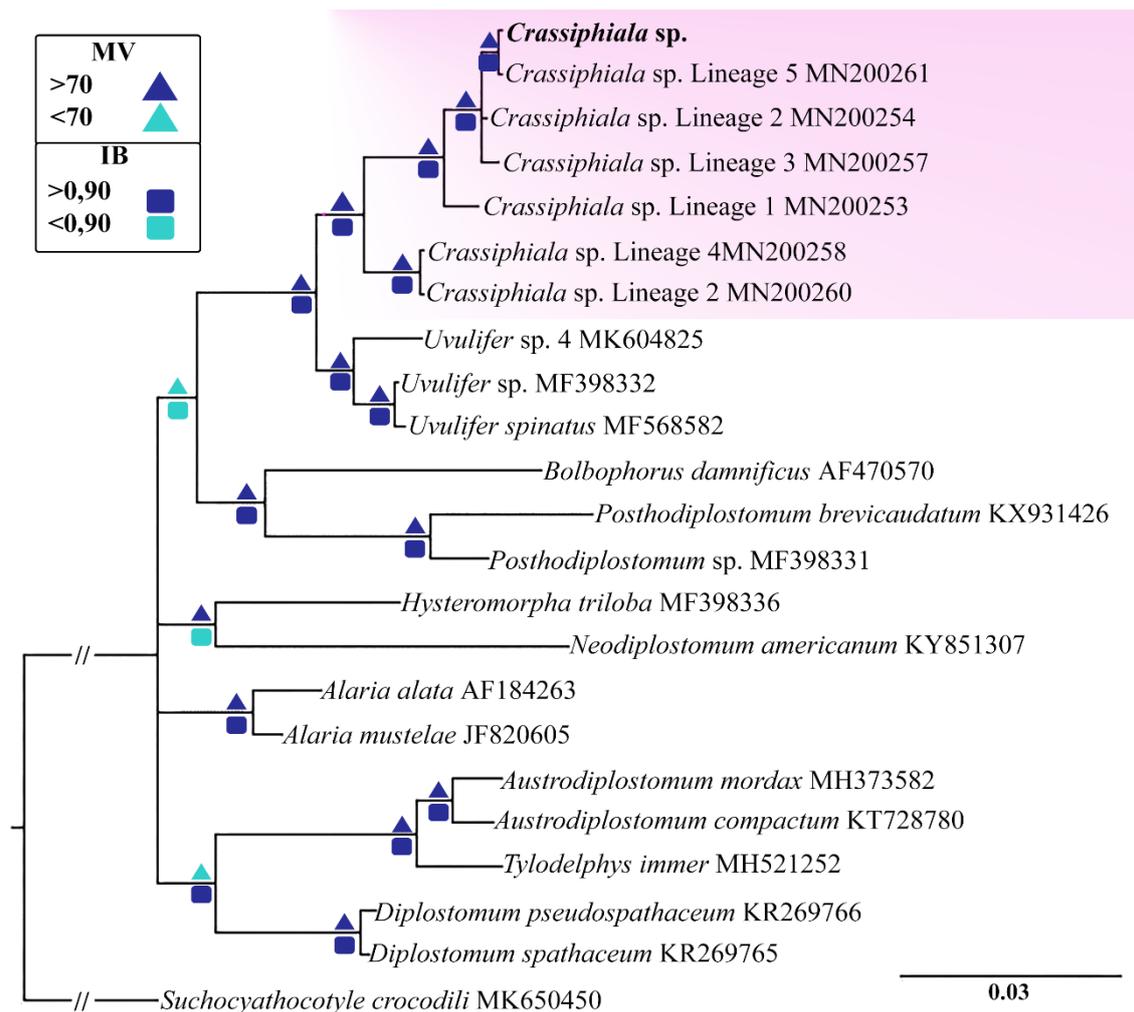


FIGURA 42- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene 28S para as amostras de *Crassiphiala* sp. (em negrito) e outras espécies de Diplostomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+G. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Suchocyathocotyle crocodili* foi usado como grupo externo.

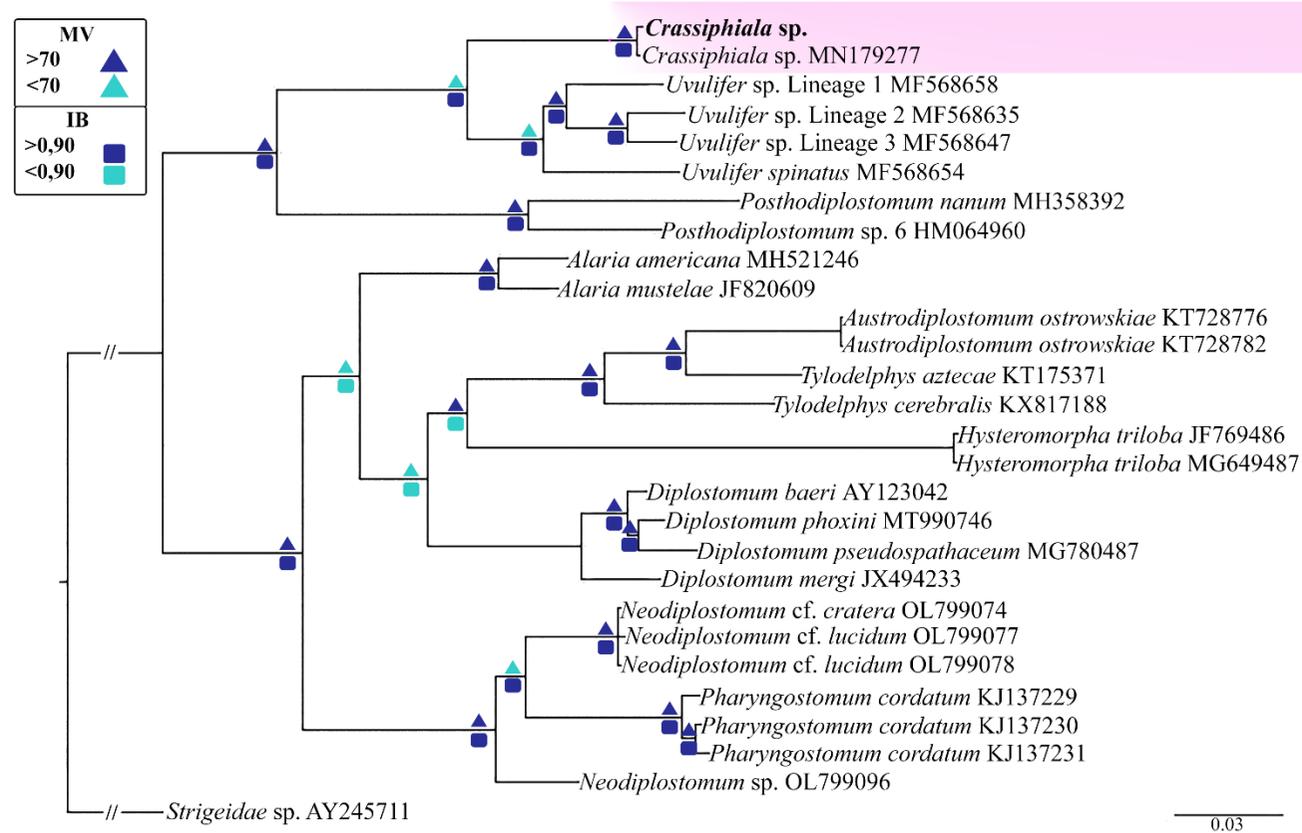


FIGURA 43- Relação filogenética baseada na análise de seqüências parciais da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) para as amostras para as amostras de *Crassiphiala sp.* (em negrito) e outras espécies de Diplostomoidea com seqüências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+G+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Strigeidae sp.* foi usado como grupo externo.

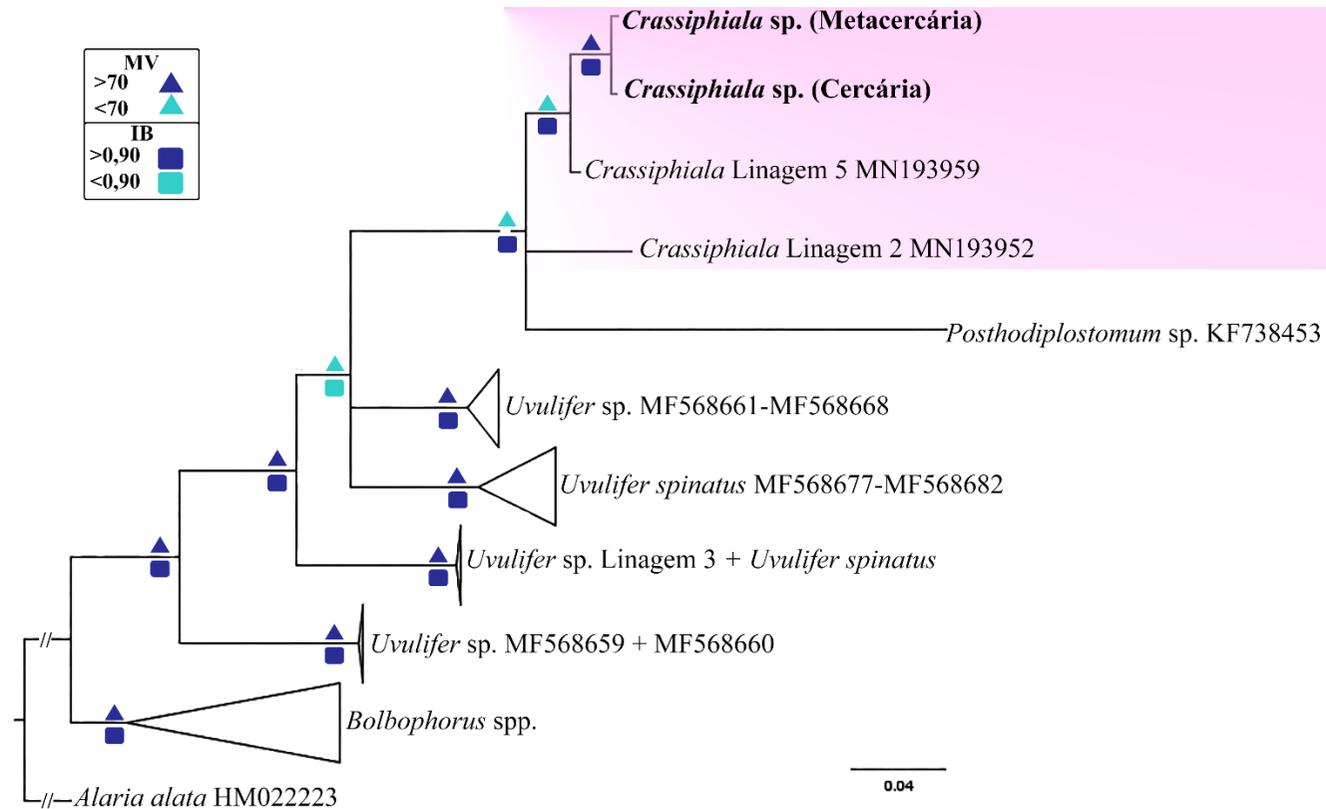


FIGURA 44- Relação filogenética baseada na análise de seqüências parciais do gene mitocondrial *Cox-1* (Região *pós-barcode*) para as amostras de *Crassiphiala* sp. (em negrito) e outras espécies de Diplostomoidea com seqüências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+G. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Alaria alata* foi usado como grupo externo.

### 5.3.2.2- Diplostomidae gen. sp. (Diplostomoidea: Diplostomidae)

Localidade: São Joaquim, Januária, Minas Gerais, Brasil.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Drepanotrema lucidum*

#### 5.3.2.2.1- Caracterização morfológica

Larva do tipo distoma, faringeada, longifurcada (Figura 45). Corpo alongado, de mais largo que o tronco da cauda. Tegumento espinhoso. Órgão anterior subterminal, oval, coberto por fileiras de pequenos espinhos. Faringe muscular, arredondada. Esôfago curto. Bifurcação dos cecos intestinais anterior à ventosa ventral. Cecos que se estendem até a margem posterior da ventral. Ventosa ventral ligeiramente pós equatorial, arredondada, com uma coroa de espinhos. Glândulas de penetração antero-laterais ao acetábulo, de difícil visualização, não sendo possível determinar com exatidão se haviam mais de dois pares. Os ductos das glândulas de penetração se dirigem à região anterior do corpo, passando por trás da ventosa ventral e depois sinuosamente a cada lado do esôfago e faringe, formando reservatórios amplos antes e dentro do órgão anterior que desembocam em poros em cada lado do orifício oral. Furcas muito longas, do mesmo tamanho que o tronco caudal. O canal excretor que parte da vesícula excretora, corre pela linha meia do tronco caudal, se bifurca nas furcas, desembocando quase no final da margem anterior destas. As medidas das cercárias de Diplostomidae gen. sp. do presente estudo são apresentadas na Tabela 19.

#### 5.3.2.2.2- Estudo molecular

A análise filogenética realizada com o marcador 28S (Figura 46) (1200pb) revelou que o parasito em estudo é um representante da família Diplostomidae. Foi verificada a formação de um clado contendo espécies do gênero *Neodiplostomum*, sendo verificadas divergências nucleotídicas de 2,2-5,4%. No caso do marcador ITS1-5.8S-ITS2 (Figura 47), foi possível obter um fragmento de 993 pb. As análises filogenéticas revelaram que a espécie estudada forma um clado como espécies de *Neodiplostomum* e *Pharyngostomum cordatum* (Diesing, 1850). A divergência nucleotídica em relação a três linhagens/espécies de *Neodiplostomum* incluídas nas análises foi de 8,8-9%. Já a comparação com isolados de *Pharyngostomum cordatum* (Diesing, 1850) da China

resultou em divergências moleculares de 9,7-10,2%. Quando comparado com outras espécies da família Diplostomidae, as divergências neste marcador variaram de 12,7-18%. As análises filogenéticas baseada em sequências do gene mitocondrial *Cox-1* (508 pb da região barcode), não revelaram agrupamento com nenhuma das espécies disponíveis para comparação (Figura 48) (divergências nucleotídicas de 15,6-20,9%). Considerando-se as 7 espécies de *Neodiplostomum* incluídas nas análises as diferenças foram de 15,6-19%, superior às divergências interespecíficas conhecidas para o gênero (8,6-13,4%) (ACHATZ *et al.*, 2022b) (Anexo 2: Tabelas 22, 23 e 24).

#### 5.3.2.2.3- Comentários taxonômicos

A análise morfológica da larva identificada como Diplostomidae gen. sp. revelou similaridade com uma identificada como *Cercaria stephensi* 2, encontrada em *Lymnaea stagnalis* nos Estados Unidos e (BROOKS, 1943). Entretanto, estas larvas possuem medidas do corpo e ventosas maiores do que as obtidas para a cercária do presente estudo. Algumas características como a presença de espinhos no órgão anterior e tegumento são compatíveis com o conhecido para as cercárias dos gêneros *Alaria* Schrank, 1788, *Pharyngostomum* Ciurea, 1922, *Neodiplostomum* Railliet, 1919, *Procyotrema* Harkema & Miller, 1959, *Paralaria* Kraus (1914) e *Didelphodiplostomum* Dubois, 1944. Os dados obtidos nas análises filogenéticas revelam maior proximidade com *Neodiplostomum*, mas a possibilidade de se tratar de outro gênero não pode ser descartada, especialmente pelo fato de alguns gêneros da família endêmicos da América do Sul ainda não foram sequenciados. Deste modo, optou-se pela identificação desta larva apenas em nível de família.

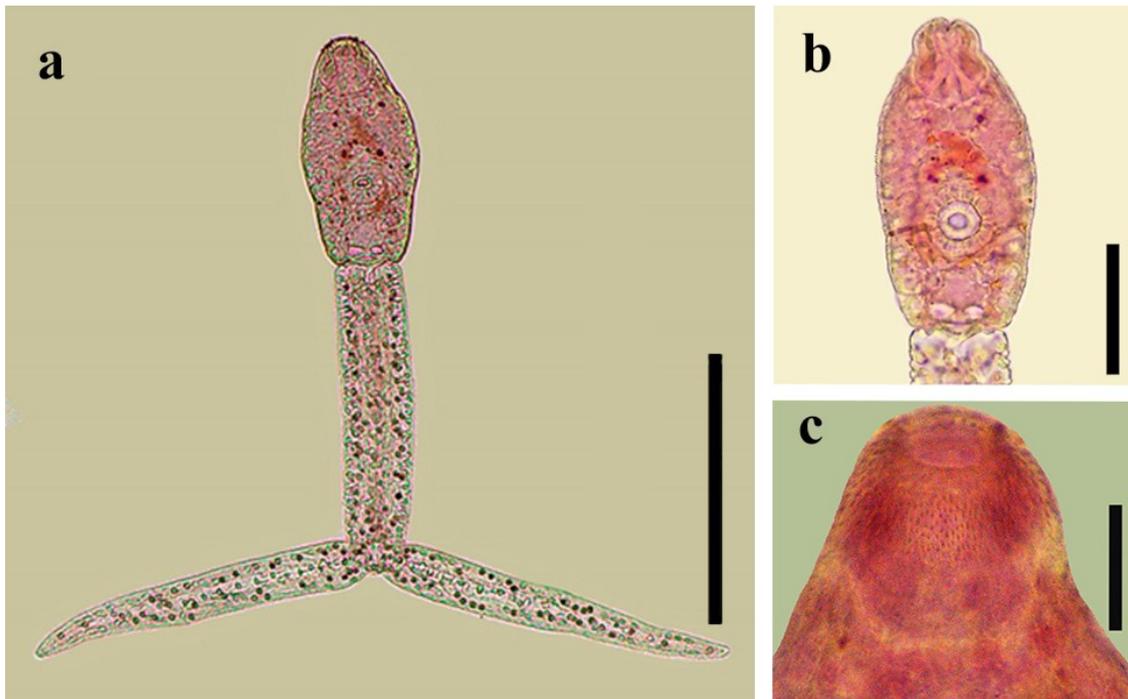


FIGURA 45- Diplostomidae gen. sp. (a) Cercária emergida de *Drepanotrema lucidum* naturalmente infectado coletado em Januária, Minas Gerais, Brasil. (b) Detalhe do corpo cercariano. (c) Detalhe dos espinhos no órgão anterior. Escalas: 200  $\mu\text{m}$  (a), 50  $\mu\text{m}$  (b), 20  $\mu\text{m}$  (c).

TABELA 19- Dados morfométricos de cercárias de Diplostomidae gen. sp. obtidas de *Drepanotrema lucidum* em Januária, Minas Gerais, Brasil e dados sobre larvas similares para comparação

<b>Espécie</b>		<b>Diplostomidae gen. sp.</b>	<b><i>Pharyngostomum cordatum</i></b>	<b><i>Neodiplostomum lucidum</i></b>	<b><i>Neodiplostomum intermedium</i></b>	<b><i>Cercaria stephensi</i> n. sp. 2</b>
<b>Localidade</b>		Brasil	China	EUA	Austrália	EUA
<b>Hospedeiro</b>		<i>Drepanotrema lucidum</i>	<i>Segmentina congener</i>	<i>Physa ampullacea</i>	<i>Posticobia brazier</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>
<b>Referência</b>		Presente estudo	WALLACE (1939)	WEST (1935)	PEARSON (1961)	BROOKS (1943)
<b>Corpo</b>	C	136 ± 15 (106-156)	96-128	75-117	160 (123-190)	177 (140-210)
	L	41 ± 3 (36-43)	36-56	24-34	34 (30-40)	56 (44-76)
<b>Tronco caudal</b>	C	188 ± 29 (128-220)	170-210	131-173	224 (189-262)	180 (124-216)
	L	26 ± 9 (14-43)	28-43	14-29	32 (24-41)	38 (36-40)
<b>Órgão anterior</b>	C	30 ± 6 (20-36)	21-28	20	36 (31-44)	38 (36-45)
	L	28 ± 5 (20-36)	-	-	25 (22-31)	24 (20-25)
<b>Ventosa ventral</b>	C	28 ± 10 (18-45)	-	17	21 (20-24)	32 (28-38)
	L	28 ± 10 (18-45)	-	-	22 (18-29)	
<b>Furcas</b>	C	158 ± 33 (113-220)	-	110-157	193 (177-231)	238

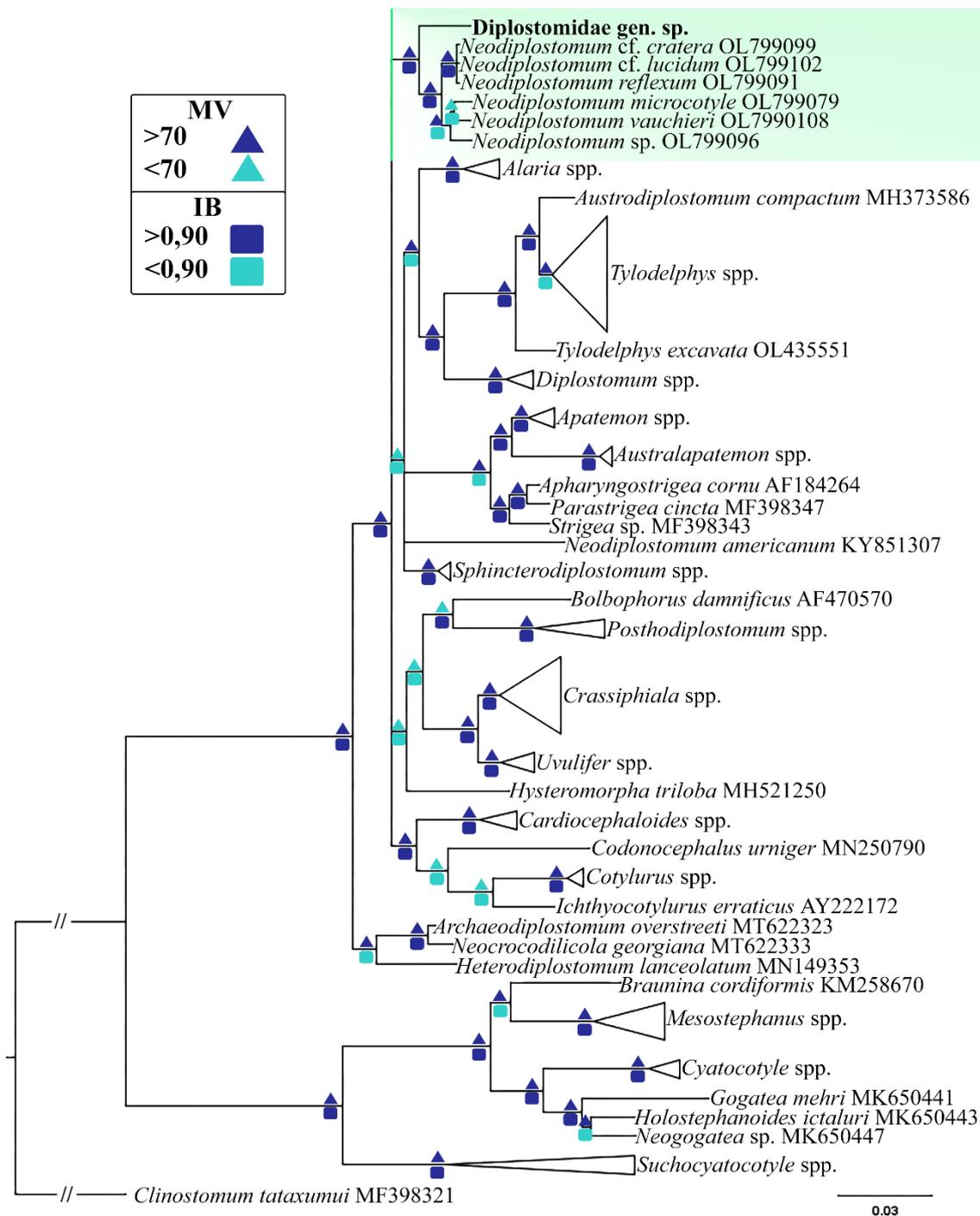


FIGURA 46 - Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene 28S para as amostras de Diplostomidae gen. sp. (em negrito) e outras espécies de Diplostomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo GTR+G+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (□) e bootstrap (△), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Clinostomum tataxumui* foi usado como grupo externo.

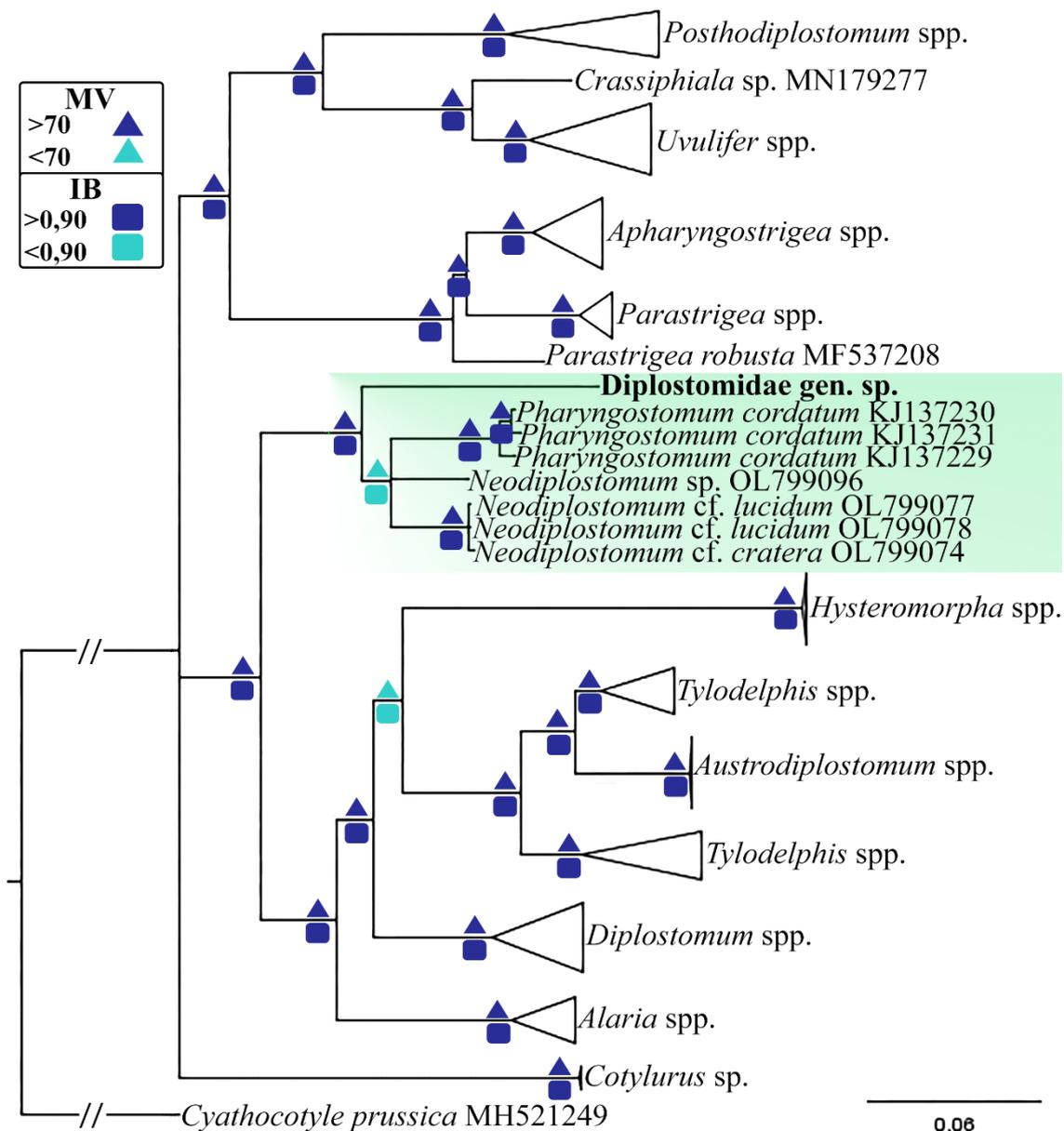


FIGURA 47- Relação filogenética baseada na análise de seqüências parciais da região transcrita interna ITS1-5.8S-ITS2 para as amostras de Diplostomidae gen. sp. (em negrito) e outras espécies de Diplostomoidea com seqüências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo GTR+G. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Cyathocotyle prussica* foi usado como grupo externo.

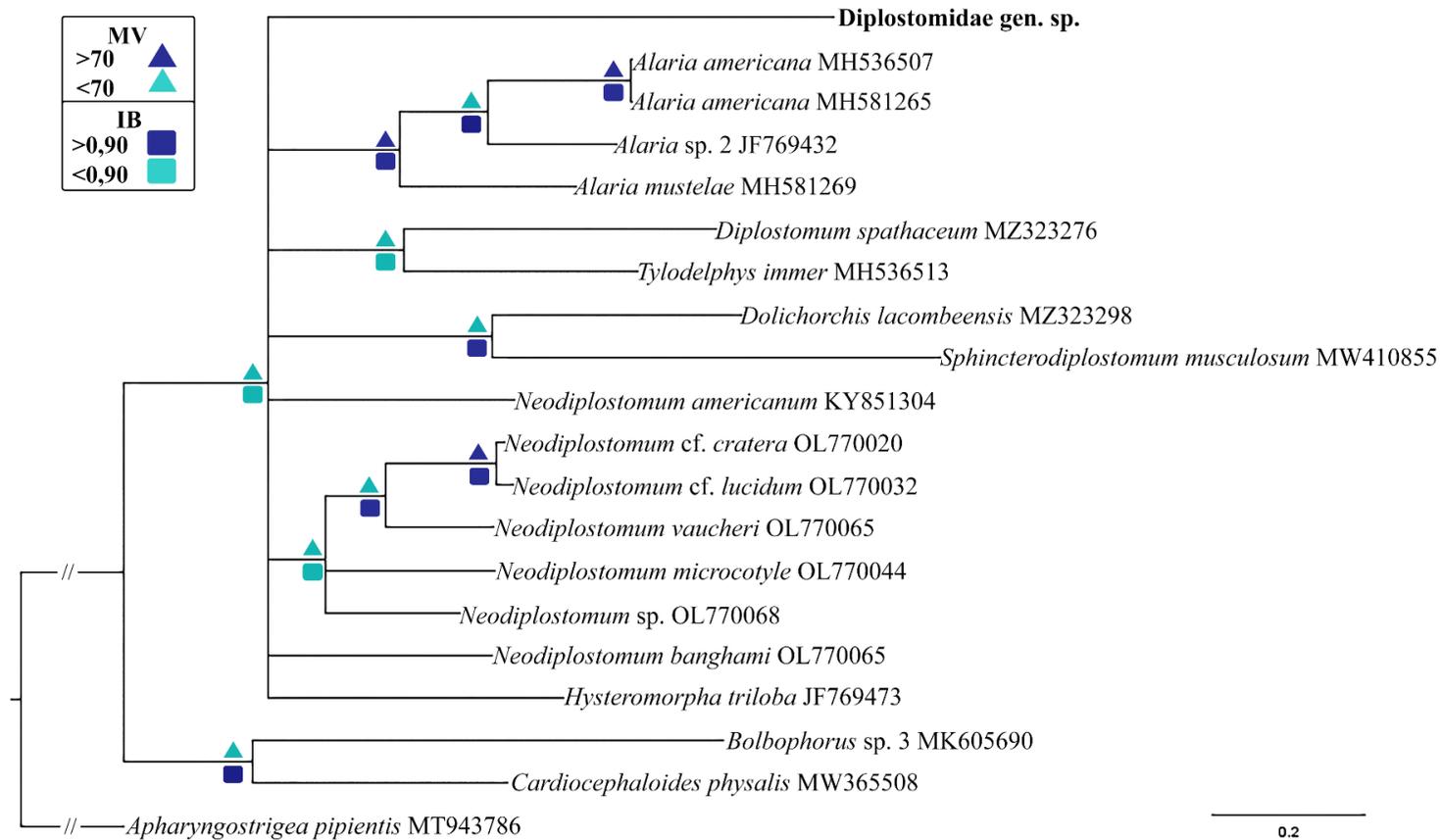


FIGURA 48- Relação filogenética baseada na análise de seqüências parciais da do gene mitocondrial Citocromo oxidase *Cox-1* (região barcode) para as amostras de *Diplostomidae gen. sp.* (em negrito) e outras espécies de *Diplostomoidea* com seqüências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo TN93+G+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Apharyngostrigea pipientis* foi usado como grupo externo.

### 5.3.2.3- *Apharyngostrigea pipientis* (Diplostomoidea: Strigeidae)

Localidade: Belo Horizonte e Contagem, Minas Gerais, Brasil.

Primeiro hospedeiro intermediário: *Biomphalaria straminea*.

#### 5.3.2.3.1- Caracterização morfológica

A avaliação morfológica desta espécie foi previamente realizada por PINTO (2013) quem identificou o parasito à época por abordagem experimental como *Apharyngostrigea* sp. 2. A larva correspondente ao novo isolado analisado é apresentada na Figura 49.

#### 5.3.2.3.2- Estudo molecular

Um fragmento da região ITS1-5.8S-ITS2 (1269 pb) (Figura 50) foi obtido de cercárias provenientes de *B. straminea* em Contagem, Minas Gerais. O alinhamento final foi de 1056 pb. O isolado analisado agrupou-se com bom suporte com os isolados Norte Americanos de *A. pipientis*. As divergências moleculares variaram de 0-0,1%. Além disso, quatro sequências de parasitos identificados como *A. cornu* (JX977837-40) obtidos de ardeídeos no México (HERNÁNDEZ-MENA *et al.*, 2014) também foram idênticos a *A. pipientis*, sendo estes isolados mexicanos provavelmente identificados incorretamente.

Já para o gene mitocondrial *Cox-1*, foi obtido um fragmento de 557 pb. Nas análises filogenéticas realizadas com um alinhamento de 420 pb (Figura 51) foi observado o agrupamento da espécie avaliada neste estudo com os isolados de *A. pipientis* oriundos da Argentina, Canadá e Tanzânia, com divergências moleculares entre 0 e 1,5%. Além disso, o isolado brasileiro de *A. pipientis* difere significativamente de *A. cornu* (7,1-8,6%) e de *A. simplex* (13,6-14%), esta última espécie já relatada no Brasil (Anexo 2: Tabelas 25 e 26).

#### 5.3.2.3.3- Comentários taxonômicos

As cercárias de *A. pipientis* aqui estudadas estão de acordo com as descrições de HUGHES (1929) e OLIVIER (1940). Elas também se assemelham às encontradas em *B. tenagophila* no Brasil por LUTZ (1931), e identificadas como *Hysteromorpha triloba* (Rudolphi, 1819), o que provavelmente trata-se de um erro de identificação, como já

discutido por outros autores (OLIVIER, 1940; HUGGHINS, 1954; PINTO, 2013). A morfologia geral das cercárias, incluindo o número e a disposição das glândulas de penetração e a forma da cauda, são semelhantes a larvas identificadas como *Apharyngostrigea* sp. encontradas em *B. glabrata* em Guadalupe (NASSI, 1987), *Cercaria hinchicauda* em *Biomphalaria kuhniana* (Clessin, 1883) na Venezuela (NASIR e DÍAZ, 1973), *Furcocercaria* sp. III em *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981 e *B. tenagophila* na Argentina (FERNÁNDEZ *et al.*, 2016; OSTROWSKI DE NÚÑEZ *et al.*, 1991). Essas outras larvas relatadas na América do Sul podem também ser coespecíficas com *A. pipientis*. No entanto, evidências experimentais ou moleculares são necessárias para uma identificação inequívoca. Os dados moleculares obtidos possibilitaram a identificação destas cercárias como *A. pipientis*, sendo esta a primeira confirmação da ocorrência da espécie no Brasil.

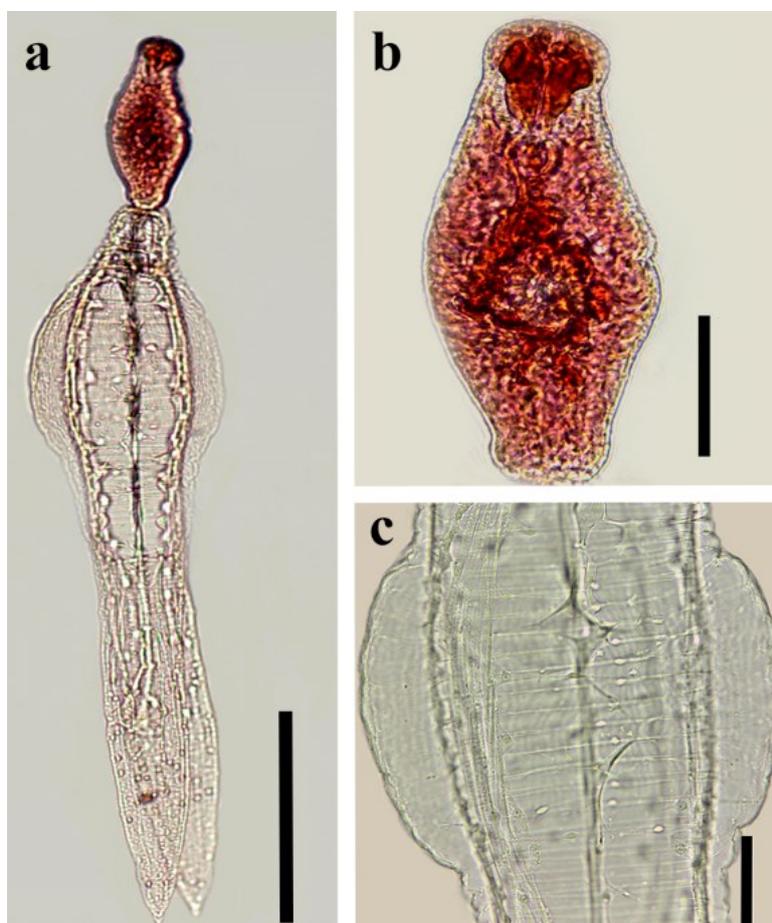


FIGURA 49- *Apharyngostrigea pipientis* (a) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* naturalmente infectada coletada em Contagem, Minas Gerais, Brasil. (b) Detalhe do corpo cercariano. (c) Detalhe da largura do tronco caudal. Escalas: 200  $\mu$ m (a), 50  $\mu$ m (b,c).

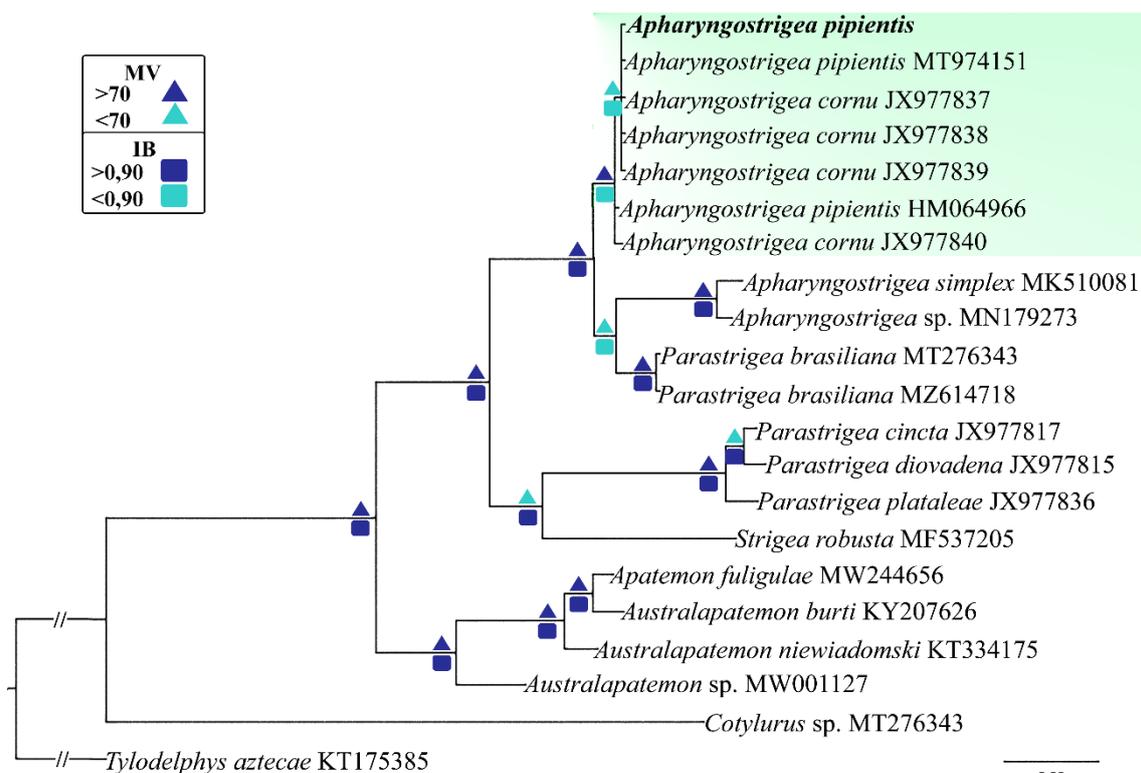


FIGURA 50- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região espaçadora transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) para as amostras de *Apharyngostrigea pipientis* (em negrito) e outras espécies de Diplostomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo K2+G. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (□) e bootstrap (△), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Tylodelphys azteca* foi usado como grupo externo.

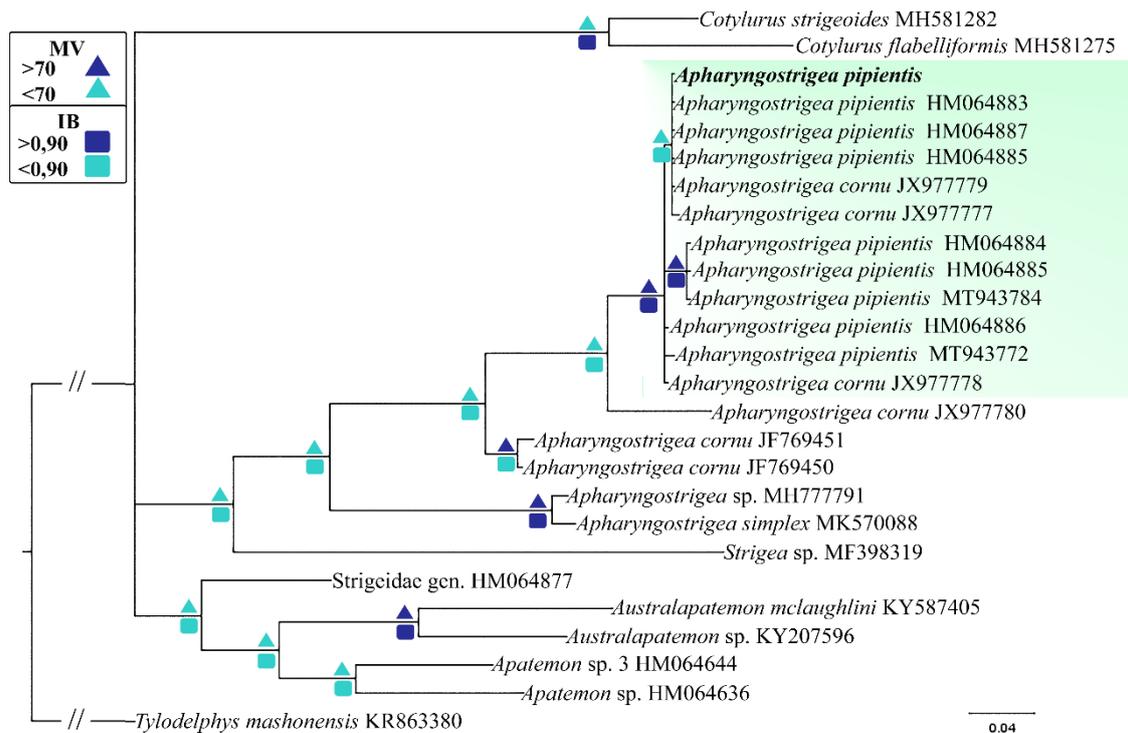


FIGURA 51- Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do gene citocromo c oxidase subunidade I *Cox-1* (região barcode) para as amostras de *Apharyngostrigea pipientis* (em negrito) e outras espécies de Diplostomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo HKY+G+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (□) e bootstrap (△), de acordo com a escala representada no canto superior esquerdo. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Tyloodelphys mashonensis* foi usado como grupo externo

### 5.3.3 Discussão

Três estrigeocercárias e uma metacercária do tipo *Neascus*, encontradas em moluscos do gênero *Biomphalaria* e peixes ornamentais de Belo Horizonte e Contagem foram identificadas neste estudo por abordagem morfológica e molecular

Cercárias encontradas em *B. straminea* e metacercárias aqui registradas causando a doença dos pontos pretos em peixes ornamentais, *Etroplus maculatus*, foram identificadas através da análise molecular como *Crassiphiala* sp. As espécies deste gênero são, em seu estágio adulto, parasitos de aves da família Alecedinidae, popularmente conhecidos como martins pescadores (DUBOIS, 1968). A espécie-tipo do gênero, *Crassiphiala bulboglossa* Van Haitsma, 1925, foi descrita a partir de vermes encontrados no intestino de *Megaceryle alcyon* (L.) nos EUA e desde então, relatada apenas na região Neártica (SCOTT, 1984; NIEWIADOMSKA, 2002; MUZZALL *et al.*, 2011). No que se refere ao ciclo biológico, *C. bulboglossa* apresenta um padrão de ciclo similar ao relatado para as espécies da subfamília Crassiphialinae, incluindo moluscos planorbídeos como primeiros hospedeiros intermediários (HOFFMAN, 1956). Ressalta-se que algumas espécies de diplostomídeos pertencentes aos gêneros *Hysteromorpha* Lutz, 1931, *Uvulifer* Dubois, 1988, *Posthodiplostomum* Dubois, 1936 e *Crassiphiala* (HOFFMAN, 1965), estão associadas à doença dos pontos pretos em peixes. Nestes casos, o encistamento do parasito e formação de metacercárias no tegumento do peixe leva a reação inflamatória resultando em melanização, ao redor do parasito (HUNTER, 1933; HOFFMAN, 1956; NIEWIADOMSKA, 2002; MCALLISTER *et al.*, 2013). As alterações patológicas incluem ainda danos mecânicos, hemorragias e infecções secundárias. Estes processos patológicos além de causar danos ao peixe, resultam em um aspecto repugnante, fazendo que seja rejeitado pelos consumidores tanto para consumo quanto para fins ornamentais (LANE & MORRIS, 2000).

No Brasil, o único registro deste gênero em aves foi realizado recentemente por ACHATZ *et al.* (2019), sendo duas linhagens (4 e 5) encontradas parasitando um exemplar de martim-pescador-grande *Megaceryle torquata*, no Pantanal, no estado de Mato Grosso. Quanto às metacercárias, existem vários relatos de metacercárias causando a doença dos pontos pretos em diferentes espécies de peixes no país (CARVALHO *et al.*, 2008; FLORES-LÓPES, 2014; BARRILLI *et al.*, 2021), porém, nenhum desses trabalhos identificou o agente causador da doença. No caso das fases larvais encontradas em moluscos, os dados obtidos no presente estudo permitiram associar a cercária previamente

caracterizada identificada como Crassiphialinae gen. sp. por LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.* (2019) às metacercárias de *E. maculatus*. A obtenção de espécimes adultos, por abordagem experimental ou a partir de aves naturalmente infectadas, seguida da geração de sequências nucleotídicas se faz necessária para a descrição desta provável espécie nova de diplostomídeo endêmica do Brasil.

Estrigeocercárias encontradas em *Drepanotrema lucidum* em Januária, Minas Gerais, foram identificadas como Diplostomidae gen. sp. Algumas características morfológicas gerais desta larva são semelhantes à conhecida para determinadas larvas de diplostomídeos conhecidas (espécies dos gêneros *Alaria*, *Paralaria*, *Pharyngostomum*, *Procyotrema* e *Neodiplostomum*). Contudo, no estudo molecular, não foram geradas informações que permitissem a associação inequívoca com estes gêneros. O gênero *Neodiplostomum* foi o que apresentou maior proximidade filogenética, tanto do marcador 28S quanto ITS1-5.8S-ITS2. Este grupo é bastante diverso na América do Sul, sendo conhecidas onze espécies (duas registradas em mamíferos e nove em aves), a maior parte delas (7 espécies) relatadas no Brasil (LUNASCHI & DRAGO, 2005; FERNANDES *et al.*, 2015, GRANDÓN-OJEDA *et al.*, 2018; ACHATZ *et al.*, 2022b). Apesar disso, não existem relatos de larvas (cercárias e metacercárias) de espécies deste gênero no país. Na análise com o marcador mitocondrial *Cox-1*, foram encontradas divergências maiores (15,6-20,9%) á relatada entre as espécies do gênero já sequenciadas (8,6-13,4%) (ACHATZ *et al.*, 2022b). Nesse sentido, a possibilidade de se tratar de outro gênero diferente de *Neodiplostomum* não pode ser descartada, tendo em conta o cenário atual de escassez de informações moleculares para os representantes da família Diplostomidae, vários ainda sem nenhuma informação molecular disponível.

Um dado interessante de mencionar é que, na árvore de ITS, as sequências de *Pharyngostomum* e *Neodiplostomum* agruparam num mesmo clado que Diplostomidae gen. sp. com um bom suporte. Contudo, segundo NIEWIADOMSKA (2002), estes gêneros pertencem a subfamílias diferentes (o primeiro Diplostominae e o último Alariinae). Além disso, como evidenciado por autores (ACHATZ *et al.*, 2019, 2021a, 2021b; QUEIROZ *et al.*, 2020), as análises filogenéticas realizadas neste estudo também não revelaram coerência no estabelecimento de subfamílias entre os membros da família Diplostomidae.

A cercária longifurcada com tronco caudal largo aqui estudada foi associada a *Apharyngostrigea pipientis* através de estudo molecular. O primeiro relato desta espécie foi realizado por FAUST (1918), quem encontrou metacercárias em anfíbios, *Lithobates*

*pipiens* Schreber, 1782, nos EUA, descrevendo-as como *Tetracotyle pipientis*. Anos mais tarde no mesmo país, OLIVIER (1940) descreveu todos os estágios de desenvolvimento desta espécie, incluindo cercárias de *Planorbula armigera* (Say, 1821), metacercárias de *L. pipiens* infectada natural e experimentalmente, e adultos recuperados de pombos domésticos infectados experimentalmente.

Os registros de *A. pipientis* em *B. straminea* e *B. tenagophila* sugerem que o parasito está presente há muito tempo na região Neotropical. Os moluscos do gênero *Biomphalaria* estão intimamente relacionados com *Planorbula armigera*, primeiro hospedeiro intermediário de *A. pipientis* na região onde a espécie foi descrita (OLIVIER, 1940; ALBRECHT *et al.*, 2007). No caso dos segundos hospedeiros intermediários, há relatos de metacercárias de *A. pipientis* em anuros hílideos e ranídeos da América do Norte (OLIVIER, 1940; ULMER, 1970; MCALPINE, 1997; GOLDBERG *et al.*, 2002; SCHOTTHOEFER *et al.*, 2009; LOCKE *et al.*, 2011; PULIS *et al.*, 2011). Adicionalmente, no nordeste da América do Norte, MCALPINE (1997) registrou *A. pipientis* em *L. pipiens* e *Aquarana catesbeiana* (Shaw, 1802), sendo esta última globalmente invasiva (LOWE *et al.*, 2000) e está estabelecida em todas as Américas, incluindo Argentina e Brasil (KRAUS, 2009). A ocorrência de *A. pipientis* no Brasil é confirmada pela primeira vez neste estudo. Metacercárias de *Apharyngostrigea* com morfologia compatível com essa espécie foram encontradas encistadas em *Poecilia reticulata* na Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte (PINTO & MELO, 2012c). É importante destacar que os dados moleculares obtidos, associados a informações obtidas de parasitos recuperados em diferentes países, demonstram a ocorrência de um mesmo haplótipo de *A. pipientis* no Brasil, México, Canadá, Argentina e Tanzânia (LOCKE *et al.*, 2021). Este achado pode indicar a participação de aves migratórias na manutenção da espécie nestes locais.

## 6.- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da importância médica, veterinária e principalmente ecossistêmica de trematódeos pertencentes às superfamílias Echinostomatoidea, Plagiorchioidea e Diplostomoidea, os resultados obtidos neste estudo apontam a necessidade de novas pesquisas visando ampliar o conhecimento da biologia e taxonomia destes helmintos. De fato, mais de 300 espécies de trematódeos adultos pertencentes a estes três grandes grupos já foram reportadas na América do Sul (KOHN *et al.*, 2007; FERNANDES & KOHN, 2014; FERNANDES *et al.*, 2015). Contudo, apenas 52 espécies (17%) possuem ciclo biológico conhecido. Além disso, uma diversidade de larvas destes parasitos (mais de 230 registros) foi encontrada em moluscos e identificadas até nível de família, subfamília ou como táxon de grupo coletivo (*Cercaria*, *Furcocercaria*, *Echinocercaria*, *Xifidiocercaria*). No Brasil, esforços têm sido realizados nos últimos anos visando preencher esta lacuna no conhecimento de estágios larvais de trematódeos encontrados em moluscos. Trabalhos envolvendo a realização de infecções experimentais lograram sucesso em alguns casos (PINTO *et al.*, 2010a, b, 2012; 2013c, 2015b, 2016), porém, existem dificuldades para avançar com alguns grupos de trematódeos, como por exemplo, parasitos de anfíbios e répteis, ou espécies que necessitam de determinados grupos de invertebrados como segundo hospedeiro intermediário. A criação e manutenção laboratorial desses invertebrados e vertebrados torna-se impeditiva para a realização de infecções experimentais.

Nos últimos tempos, alguns dos empecilhos relacionados ao estudo de larvas de trematódeos encontradas em moluscos começaram a ser superados com a biologia molecular. Além disso, análises filogenéticas fornecem subsídios para discutir as inter-relações entre membros de diferentes grupos de trematódeos, desafiando os esquemas de classificação tradicionais baseados em morfologia clássica (HERNÁNDEZ-MENA *et al.*, 2016). Assim, o uso da técnica de PCR e sequenciamento de DNA, associado a estudos filogenéticos, têm se demonstrado uma abordagem promissora para a identificação de várias espécies de trematódeos ao redor do mundo (BRANT *et al.*, 2006; LOCKE *et al.*, 2011; FALTÝNKOVÁ *et al.*, 2014; BLASCO-COSTA *et al.*, 2016). No Brasil, algumas poucas sequências destes três grupos foram geradas recentemente, com uma participação significativa do nosso grupo de pesquisa (PINTO *et al.*, 2013; 2016; LÓPEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2018; 2019; QUEIROZ *et al.*, 2019; VALADÃO *et al.*, 2021). Contudo, diante da grande riqueza de espécies previamente registradas no país, esforços

maiores ainda são necessários para a geração e interpretação das primeiras sequências a serem obtidas para a maioria das espécies destas superfamílias, muitas delas, registradas até o momento apenas no país.

A abordagem molecular utilizada para o estudo de 67 amostras de cercárias encontradas em moluscos no Brasil revelou, por um lado, alguns avanços. Contudo, evidenciou-se também as dificuldades inerentes à identificação estádios larvais. Das espécies encontradas, apenas 2 foram identificadas em nível de espécie. Outras 9 espécies foram determinadas em nível de gênero, 8 como família e 1 em nível de superfamília. A ausência de sequências referências baseadas em parasitos adultos para a fauna de trematódeos neotropicais é o principal desafio para a identificação específica de cercárias. Contudo, a adição e disponibilização das novas sequências geradas poderá resultar no aprofundamento das identificações no futuro, a medida em que novas informações forem geradas. Além disso os dados obtidos apontam, em vários casos, que a classificação morfológica precisa ser revista e possíveis novos gêneros de trematódeos ocorrem nesta região do globo. Sob essa perspectiva, estudos integrativos envolvendo trematódeos de animais silvestres na América do Sul são necessários para o avanço de diversos aspectos relacionados à taxonomia, filogenia e ciclo de vida deste fascinante grupo de helmintos. Mesmo com os empecilhos aqui comentados, as novas informações obtidas contribuem para conhecimento de alguns trematódeos das superfamílias Echinostomatoidea, Plagiorchioidea e Diplostomoidea que ocorrem em vertebrados e moluscos no Brasil.

## 7.- CONCLUSÕES

O estudo morfológico e molecular de 28 amostras de cercárias encontradas em 11 espécies de moluscos dulceaquícolas em diferentes coleções aquáticas do Brasil revelou a ocorrência de 20 espécies de trematódeos pertencentes às superfamílias Echinostomatoidea (12 espécies), Plagiorchioidea (5) e Diplostomoidea (3).

*Pomacea maculata* é o primeiro hospedeiro intermediário de Echinochasmidae gen. sp., provavelmente uma espécie do gênero *Guaicaipuria*.

Cercárias do tipo magnacauda com 19 espinhos no colar cefálico foram identificadas como pertencentes ao gênero *Neopetasiger*.

*Cercaria granulifera*, previamente associada a *Paryphostomum segregatum*, não pode ser associado a nenhum dos gêneros com dados moleculares disponíveis para comparação. Provavelmente trata-se de um gênero ainda não relatado ou novo que não possui sequências nucleotídicas disponíveis.

O estudo molecular de *Echinostoma parcespinosum* revela que esta espécie provavelmente pertence a outro gênero da família Echinostomatidae.

Moluscos planorbídeos (*B. glabrata*, *B. straminea*, *D. lucidum* e *G. ticaga*) são os hospedeiros intermediários de espécies do gênero *Rhopalias*. As larvas destes parasitos correspondem a larvas anteriormente conhecidas como *Cercaria macrogranulosa*.

*Pseudosuccinea columella* atua como hospedeiro intermediário de uma espécie do gênero *Haematoloechus*, parasitos pulmonares de anfíbios.

*Biomphalaria glabrata* atua como o primeiro hospedeiro intermediário de *Magnivitellinum* sp., cuja larva era anteriormente conhecida como *Cercaria minense*.

O estudo molecular de *Cercaria santense* e *Cercaria lutzi*, xifidiocercárias amplamente encontradas em *Biomphalaria* spp. no Brasil, não resultou em avanço significativo na identificação destes parasitos. A primeira revelou-se tratar de uma espécie da superfamília

Plagiorchioidea, enquanto a segunda, da família Haematoloechidae. Adicionalmente, *Stenophysa marmorata* atua como primeiro hospedeiro intermediário de trematódeos do gênero *Renifer* no Brasil.

*Biomphalaria straminea* e *Etropolis maculatus* atuam como primeiro e segundo hospedeiro intermediário, respectivamente, de *Crassiphiala* sp., espécie envolvida na ocorrência da Doença dos Pontos Pretos em peixes ornamentais no Brasil.

*Apharyngostrigea pipientis* é identificado pela primeira vez no Brasil.

## 8- REFERÊNCIAS

Achatz TJ, Bell JA, Melo FTV, Fecchio A & Tkach VV 2021a. Phylogenetic position of *Sphincterodiplostomum* Dubois, 1936 (Digenea: Diplostomoidea) with description of a second species from Pantanal, Brazil. *Journal of Helminthology* 95: 1-8.

Achatz TJ, Chermak TP, Martens JR, Pulis EE, Fecchio A, Bell JA, Greiman SE, Cromwell KJ, Brant SV, Kent ML & Tkach VV 2021b. Unravelling the diversity of the Crassiphialinae (Digenea: Diplostomidae) with molecular phylogeny and descriptions of five new species. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases 1*: 1-24.

Achatz TJ, Chermak TP, Martens JR, Woodyar ET, Rosser TG, Pulis E & Tkach VV 2022a. Molecular phylogeny supports invalidation of *Didelphodiplostomum* and *Pharyngostomoides* (Digenea: Diplostomidae) and reveals a *Tylodelphys* from mammals. *Zoological Journal of the Linnean Society* 20: 1-13.

Achatz TJ, Pulis EE, Fecchio A, Schlosser IJ & Tkach VV 2019. Phylogenetic relationships expanded diversity and distribution of *Crassiphiala* spp. (Digenea, Diplostomidae), agents of black spot disease in fish. *Parasitology Research* 118: 2781-2787.

Achatz TJ, Pulis EE, Woodyard ET, Rosser TG, Martens JR, Weinstein SB & Tkach, VV 2022b. Molecular phylogenetic analysis of *Neodiplostomum* and *Fibricola* (Digenea, Diplostomidae) does not support host-based systematics. *Parasitology* 149: 1-42.

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.

Adlard RD, Barker SC, Blair D & Cribb TH 1993. Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of Fasciolidae (Digenea). *International Journal for Parasitology* 23: 423-425.

Aksenova OV, Bespalaya 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.

Alberson NR, Rosser TG, King DT, Woodyard ET, Khoo LH, Baumgartner WA & Griffin MJ 2022. Experimental Elucidation of the Life Cycle of *Drepanocephalus spathans* (Digenea: Echinostomatidae) with Notes on the Morphological Plasticity of *D. spathans* in the United States. *Journal of Parasitology* 108: 141-158.

Alda MDP & Martorelli S 2014. Larval trematodes infecting the South-American intertidal mud snail *Heleobia australis* (Rissooidea: Cochliopidae). *Acta Parasitologica* 59: 50-67.

Alda MDP, Bonel N, Hechinger RF & Martorelli SR 2013. *Maritrema orensense* and *Maritrema bonaerense* (Digenea: Microphallidae): descriptions, life cycles, and comparative morphometric analyses. *Journal of Parasitology* 99: 218-228.

Albrecht C, Kuhn K & Streit B 2007. A molecular phylogeny of Planorboidea (Gastropoda, Pulmonata): insights from enhanced taxon sampling. *Zoologica Scripta* 36: 27-39.

Alda MDP 2011. Estadios larvales de digeneos parásitos de *Heleobia australis* (d'Orbigny 1835) en el estuario de Bahía Blanca (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Alves PV, Assis JC, López-Hernández D, Pulido-Murillo EA, Melo AL, Locke SA & Pinto HA 2020. A phylogenetic study of the cecal amphistome *Zygocotyle lunata* (Trematoda: Zygocotylidae), with notes on the molecular systematics of Paramphistomoidea. *Parasitology Research* 119: 2511-2520.

Alves PV, Vieira FM, Santos CP, Scholz T & Luque JL 2015. A checklist of the Aspidogastrea (Platyhelminthes: Trematoda) of the world. *Zootaxa* 3918: 339-396.

Al Quraishy S, Abdel-Gaber R, Dkhil MA, Elamin M, Sale R & Ali H 2019.

Morphological re-description and phylogenetics of *Opecoeloides columbellae* (Digenea: Opecoelidae) that infects the shore rockling *Gaidropsarus mediterraneus* (Actinopterygii: Lotidae) in the Mediterranean Sea. *Regional Studies in Marine Science* 29: 1-10.

Archibald RG & Marshall A. 1931. A study of three non-furcocercous cercariae obtained from *Bullinus contortus* in the Sudan. *Parasitology* 23: 271-281.

Arya LK, Rathinam SR, Lalitha P, Kim UR, Ghatani S & Tandon V 2016. Trematode fluke *Procerovum varium* as cause of ocular inflammation in Children, South India. *Emerging Infectious Diseases* 22:192-200.

Asada J, Otagaki H, Morita D, Takeuchi T, Sakai Y, Konishi T & Okahashi K 1962. A case report on human infection with *Plagiorchis muris* in Japan. *Japanese Journal of Parasitology* 11: 512-16.

Assis JC, Lopez-Hernández D, Pulido-Murillo EA, Melo AL & Pinto HA 2019. A morphological, molecular and life cycle study of the capybara parasite *Hippocrepis hippocrepis* (Trematoda: Notocotylidae). *PloS One* 14: 1-15.

Avise JC 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, London, UK. 464 pp.

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

Barnosky AD, Matzke N, Tomiya S, Wogan GOU, Swartz B, Quental TB, Marshall C, McGuire JL, Lindsey EL, Maguire KC, Mersey B, Ferrer EA 2011. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature* 471:51-57.

Barrilli GH, Moura ENF Rocha O & Verani JR 2021. The influence of black spot disease on the relative condition factor of *Astyanax paranae* Eigenmann, 1914 (Characiformes: Characidae) in Brazilian subtropical streams. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 43: e56164-e56164.

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.

Bashkirova Y 1941. [Echinostomatids of birds of the USSR and a review of their life-cycles]. Trudy Bashkirskoi Nauchno-Issledovatel'skoi Veterinarnoi Stantsii 3: 243-300 (in Russian).

Bassani CA, Sangioni LA, Saut JPE, Headley AS & Yamamura MH 2007. Euritrematose bovina. *Semina Ciencias Agrarias* 28: 299-316.

Baudoin M 1975. Host castration as a parasitic strategy. *Evolution* 29: 335-352.

Beaver PC 1937. Experimental studies on *Echinostoma revolutum* (Froelich), a fluke from birds and mammals. *Illinois Biological Monographs* 15: 1-96.

Besprozvannykh VV, Rozhkovan KV & Ermolenko AV 2017. *Stephanoprora chasanensis* n. sp. (Digenea: Echinochasmidae): morphology, life cycle, and molecular data. *Parasitology International* 66: 863-870.

Blair D & McManus DP 1989. Restriction enzyme mapping of ribosomal DNA can distinguish between fasciolid (liver fluke) species. *Molecular and Biochemical Parasitology* 36: 201-208.

Blair D, Xu ZB & Agatsuma T 1999. Paragonimiasis and the genus *Paragonimus*. *Advances in Parasitology* 42: 113-222.

Blanar CA, Munkittrick KR, Houlahan J, MacLatchy DL & Marcogliese DJ 2009. Pollution and parasitism in aquatic animals: a meta-analysis of effect size. *Aquatic Toxicology* 93: 18-28.

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, Cutmore SC, Miller TL & Nolan MJ 2016. Molecular approaches to trematode systematics: 'best practice' and implications for future study. *Systematic Parasitology* 93: 295-306.

Boaventura MF, Fernandez MA, Thiengo SC, Silva RE & Melo AL 2002. Formas larvais de Trematoda provenientes de gastrópodes límnicos da microrregião Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. *Lundiana* 3: 45-49.

Bolek MG, Tracy HR & Janovy Jr J 2010. The role of damselflies (Odonata: Zygoptera) as paratenic hosts in the transmission of *Halipegus eccentricus* (Digenea: Hemiuridae) to anurans. *Journal of Parasitology* 96: 724-735.

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 Fish Diseases* 40: 191-203.

Bowles J & McManus DP 1993. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *International Journal for Parasitology* 23: 969-972.

Brant SV & Loker ES 2009. Molecular systematics of the avian schistosome genus *Trichobilharzia* (Trematoda: Schistosomatidae) in North America. *Journal of Parasitology* 95: 941-963.

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.

Bray RA, Gibson D & Jones A 2008. Keys to the Trematoda, Volume 3. CABI Publishing, Wallingford, UK. 824 pp.

Bray RA, Littlewood DTJ, Herniou EA, Williams B & Henderson RE 1999. Digenean parasites of deep-sea teleosts: a review and case studies of intrageneric phylogenies. *Parasitology* 119: S125-S144.

Bray RA, Waeschenbach A, Cribb TH, Weedall GD, Dyal P & Littlewood DT 2009. The phylogeny of the Lepocreadioidea (Platyhelminthes, Digenea) inferred from nuclear and mitochondrial genes: Implications for their systematics and evolution. *Acta Parasitologica* 54: 310-329.

Brooks FG 1943. Larval trematodes of Northwest Iowa. II. Four new strigeids. *Journal of Parasitology* 29: 340-347.

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

Bussetti ET, Paske A, Ruis MCE, Tomaz V & Colinelli A 1983. Helminhos parasitas de *Bubalus bubalis* no Estado do Paraná. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 35: 399-404.

Byrd EE 1935. Life history studies of Reniferinae (Trematoda, Digenea) parasitic in Reptilia of the New Orleans area. *Transactions of the American Microscopical Society* 54: 196-225.

Byrne AW, McBride L, Lahuerta-Marin A, Guelbenzu M, McNair J, Skuce RA & McDowell SW 2016. Liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in cattle in Northern Ireland: a large-scale epidemiological investigation utilising surveillance data. *Parasites & Vectors* 9: 1-14.

Caballero CE & Diaz-Ungria 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.*

Cantanhede SPD, Fernandez MA, Mattos ACD, Montresor LC, Silva-Souza N & Thiengo SC 2014. Freshwater gastropods of the Baixada Maranhense Microregion, an endemic area for schistosomiasis in the State of Maranhão, Brazil: I-qualitative study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47: 79-85.

Carvalho AR, Tavares LER & Luque JL 2008. Metacercárias tipo *Neascus* em *Geophagus brasiliensis* (Perciformes: Cichlidae) do rio do Peixe, Juiz de Fora, Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 30: 315-320.

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.

Carvalho GA, Andrade CFS & Ueta MT 2002. Experimental infection of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Larvae with the Xiphidiocercariae of a Hematolechid *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 573-578.

Chappell LH 1995. The biology of diplostomatid eye flukes of fishes. *Journal of Helminthology* 69: 97-101.

Charo-Karisa HC, Ali SE, Marijani EA, Ahmed Ibrahim N, Trinh TQ, Chadag V & Benzie J 2021. Genetic parameters for black spot disease (diplostomiasis) caused by *Uvulifer* sp. infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquacultura* 532: 1-12.

Cheng TC 1977. The microsporidian parasites of platyhelminthes: Their morphology, development, transmission and pathogenicity: Elizabeth U. Canning. Commonwealth institute of helminthology miscellaneous publication No. 2, commonwealth agricultural bureaux, farnham royal, bucks, London, UK. 32 pp.

Cheng TC, J Sulliv A & K Harris 1973. Parasitic castration of the marine prosobranch gastropod *Nassarius obsoletus* by sporocysts of *Zoogonus rubellus* (Trematoda): Histopathology. *Journal of Invertebrate Pathology* 21: 183-190.

- Choi MH, Kim SH, Chung JH, Jan HJ, Eom JH, Chung BS & Hong T. 2006. Morphological observations of *Echinochasmus japonicus* cercariae and the in vitro maintenance of its life cycle from cercariae to adults. *Journal of Parasitology* 92: 236-241.
- Church ML, Barrett PM, Swenson J, Kinsella JM & Tkach VV 2013. Outbreak of *Philophthalmus gralli* in four greater rheas (*Rhea americana*). *Veterinary Ophthalmology* 16: 65-72.
- Coelho LHL & Lima WS 2003. Population dynamics of *Lymnaea columella* and its natural infection by *Fasciola hepatica* in the state of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Helminthology* 77: 7-10.
- Cohen SC, Fernandes BMM, Gibson D, Bray RA, Pinto HA, Campião KM & Justo M 2022. Strigeidae in Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil. PNUD. Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/1192>>. Acesso em: 13 May. 2022.
- Combes C 1982. Trematodes: antagonism between species and sterilizing effects on snails in biological control. *Parasitology* 84: 151-175.
- Combes C, Fournier A, Moné H & Théron A 1994. Behaviours in trematode cercariae that enhance parasite transmission: patterns and processes. *Parasitology* 109: S3-S13.
- Costello MJ, May RM & Stork NE 2013. Can we name Earth's species before they go extinct? *Science* 339:413-416.
- 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 2016. The biodiversity of trematodes of fishes. *Systematic Parasitology* 93: 219-221.
- Cribb TH, Bray RA, Littlewood DTJ, Pichelin SP & Herniou EA 2001a. The Digenea. In

Littlewood DTJ & Bray RA (Eds.) Interrelationships of the Platyhelminthes. CRC Press, pp. 168-185.

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

Cribb TH, Bray RA, Olson PD & Littlewood DTJ 2003. Life cycle evolution in the Digenea: a new perspective from phylogeny. *Advances in Parasitology* 54: 197-254.

Cribb TH, Chisholm LA & Bray RA 2002. Diversity in the Monogenea and Digenea: does lifestyle matter? *International Journal for Parasitology* 32: 321-328.

Criscione CD, Poulin R & Blouin, MS 2005. Molecular ecology of parasites: Elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology* 14: 2247-2257.

Cross MA, Irwin SWB & Fitzpatrick SM 2001. Effects of heavy metal pollution on swimming and longevity in cercariae of *Cryptocotyle lingua* (Digenea: Heterophyidae). *Parasitology* 123: 499-507.

Curran SS, Tkach VV & Overstreet RM 2013. A new species of *Homalometron* (Digenea: Apocreadiidae) from fishes in the northern gulf of Mexico. *Journal of Parasitology* 99: 93-101.

Dare OK & Forbes MR 2009. Patterns of infection by lungworms, *Rhabdias ranae* and *Haematoloechus* spp., in northern leopard frogs: a relationship between sex and parasitism. *Journal of Parasitology* 95: 275-280.

Davies D, Davies C, Lauthier JJ, Hamann M & Ostrowski de Núñez MO 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.

Davies D, Liquin F, Lauthier JJ, Párraga R, Saravia J, Davies C & Ostrowski de Núñez

MO 2021. The life cycle of *Magnivitellinum saltaensis* n. sp. (Digenea: Alloglossidiidae) in Salta Province, Argentina. *Parasitology Research* 120: 1233-1245.

Dawes B 1968. The Trematoda: with special reference to British and Other European Forms. Cambridge University Press, London, UK. 644 pp.

Dayrat B 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407-415.

Dellagnola FA, Montes MM, Martorelli SR & Vega IA 2019. Morphological characterization and molecular phylogeny of zoonotic trematodes in the freshwater snail *Asolene platae*. *Parasitology* 146: 839-848.

Detterline JL, Jacob JS & Wilhelm E 1984. A comparison of helminth endoparasites in the cottonmouth (*Agkistrodon piscivorus*) and three species of water snakes (*Nerodia*). *Transactions of the American Microscopical Society* 103: 137-143.

Detwiler JT, Bos DH & Minchella J. 2010. Revealing the secret lives of cryptic species: Examining the phylogenetic relationships of echinostome parasites in North America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 611-620.

Díaz M, Hernández LE & Bashirullah AK 2002. Experimental life cycle of *Philophthalmus gralli* (Trematoda: Philophthalmidae) in Venezuela. *Revista de Biología Tropical* 50: 629-641.

Drago FB, Lunaschi LI & Schenone M 2011. Digenean parasites of the neotropical cormorant, *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin, 1789) (Aves: Phalacrocoracidae) from Argentina: distribution extension and new host records. *Check List* 7:871-875.

Dronen Jr NO 1975. The life cycle of *Haematoloechus coloradensis* Cort, 1915 (Digenea: Plagiorchiidae) with emphasis on host susceptibility to infection. *Journal of Parasitology* 61: 657-660.

Dubois G & Mahon J 1959. Etude de quelques trématodes nord-Américains (avec note

sur la position systématique de *Parorchis* Nicoll 1907) suivie d'une revision des genres *Galactosomum* Looss 1899 et *Ochetosoma* Braun 1901. *Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles* 82: 191-229.

Dubois G 1968. Synopsis des Strigeidae et des Diplostomatidae (Trematoda). Première Partie. *Mémoires de la Société des Sciences Naturelles de Neuchâtel* 10: 1-727.

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

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

Eduardo SL 1991. *Pegosomum ixobrychi* Gvosdev, 1960 (Trematoda: Echinostomatidae) from the liver of the cinnamon least bittern, *Ixobrychus cinnamomeus* (Gmelin, 1789) (Aves: Ardeidae) in the Philippines. *Philippine Journal of Veterinary Medicine* 28: 53-59.

Enabulele E, Lawton SP, Walker AJ & Kirk RS 2018. Molecular and morphological characterization of the cercariae of *Lecithodendrium linstowi* (Dollfus, 1931), a trematode of bats, and incrimination of the first intermediate snail host, *Radix balthica*. *Parasitology* 145: 307-312.

Ensuncho C, Herrera Benavides YM & Vergara Garay O 2017. First record of *Typhlocoelum cucumerinum* (trematode: Typhlocoelidae) in *Cairina moschata domestica* (birds: Anatidae) in Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria* 33: 35-41.

Erwin TL 1982. Tropical forests: their richness in Coleoptera and other arthropod species. *The Coleopterists Bulletin* 36:74-75.

Esteban JG, Muñoz-Antoli C, Trelis M & Toledo R 2011. Effects of nonschistosome larval trematodes on *Biomphalaria* snails. In R Toledo, B Fried, *Biomphalaria* Snails and Larval Trematodes, Springer, New York. pp. 127-158.

Etchegoin JA & Martorelli SR 1997. Description of a new species of *Maritrema* (Digenea: Microphallidae) from Mar Chiquita coastal lagoon (Buenos Aires, Argentina) with notes on its life cycle. *Journal of Parasitology* 83: 709-713.

Etchegoin JA, Merlo MJ & Parietti M 2012. The role of the invasive polychaete *Ficopomatus enigmaticus* (Fauvel, 1923) (Serpulidae) as facilitator of parasite transmission in Mar Chiquita coastal lagoon (Buenos Aires, Argentina). *Parasitology* 139: 1506-1512.

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.

Faltynkova A, Gibson DI & Kostadinova A 2008. A revision of *Patagifer* Dietz, 1909 (Digenea: Echinostomatidae) and a key to its species. *Systematic Parasitology* 70: 159-183.

Faust, EC 1918. Life History Studies on Montana Trematodes. *Illinois Biological Monographs* 4: 1-120.

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

Fernandes BJ, Cooper JD, Cullen JB, friedman 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. 225 pp.

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 MA, Thiengo SC & Simone LRL 2003. Distribution of the introduced

freshwater snail *Melanooides tuberculatus* (Gastropoda: Thiaridae) in Brazil. *Nautilus* 117: 78-82.

Fernández MV & Hamann MI 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.

Fernández MV, Hamann MI & Ostrowski de Núñez M 2014. Echinostome cercariae from *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) in a ricefield from northeastern Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 1024-1031.

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

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 notocotyloid *Catatropis chilinae*. *Journal of Parasitology* 94: 305-313.

Flores-Lopes F & Thomaz AT 2011. Assessment of environmental quality through analysis of frequency of the black spot disease in an assemblage of fish, Guaíba Lake, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 71: 915-923.

Flores-Lopes F 2014. Ocorrência da doença dos pontos pretos em *Astyanax* aff. *fasciatus* (characiformes: characidae) na bacia do lago Guaíba, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 74: S127-S134.

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

Font WF & Lotz JM 2008. Family Macroderoididae McMullen, 1937. In: Jones A, Bray RA, Gibson DI (eds) Keys to the Trematoda, vol 3. CABI. London. 373-380 pp.

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 & Graczyk TK (Eds.) 1997. Advances in Trematode Biology. CRC Press, Boca Ratón. 476 pp.

Fried B & Toledo R (Eds.) 2009. The Biology of Echinostomes: from the Molecule to the Community. (Vol. 9). Springer, New York. 333 pp.

Galaktionov KV & Dobrovolskij AA 2003. The Biology and Evolution of Trematodes: An Essay on the Biology, Morphology, Life Cycles, Transmissions, and Evolution of Digenetic Trematode. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 620 pp.

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, Hernández-Cruz E & Pérez Ponce de León 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 SL & Campbell ML 1992. Parasites as probes for biodiversity. *Journal of Parasitology* 78: 596-600.

Gentile L, Picot H, Bourdeau P, Bardet R, Kerjan A, Piriou M, Le Guennic A, Bayssa de

Dufour C, Chabasse D, Mott KE 1996. La dermatite cercarienne en Europe: un problème de sante publique nouveau? *Bulletin World Health Organ* 74: 159-163.

Georgieva S, Faltýnková A, Brown R, Blasco-Costa I, Soldánová M, Sitko J, Scholz T & Kostadinova, A 2014. *Echinostoma 'revolutum'* (Digenea: Echinostomatidae) species complex revisited: species delimitation based on novel molecular and morphological data gathered in Europe. *Parasites & Vectors* 7: 1-18.

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

Goldber SR, Burseley CR & Wong C 2002. Helminths of the western chorus frog from eastern Alberta, Canada. *Northwest Science* 76: 77-79.

Gomes FF, Oliveira FCR, Pile EA & Lopes CWG 2002. Estabelecimento de foco de fasciolose hepática em propriedade do município de Campos dos Goytacazes no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 11: 53-56.

Gonzales JC, Sanches VM, Thomé JW, Gonçalves PC & Oliveira CMB 1974. *Lymnaea columella* hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (Lin. 1758) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS* 2: 37-40.

Grabda B 1960. Life cycle of *Haematoloechus similis* (Looss, 1899) (Trematoda Plagiorchiidae). *Acta Parasitologica Polonica* 8: 357-367.

Graczyk TK & Fried B 1998. Echinostomiasis: a common but forgotten food-borne disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58: 501-504.

Grandón-Ojeda A, Valdebenito JO, Moreno L, Kinsella JM, Mironov S, Cicchino A & González-Acuña D 2018. Gastrointestinal and external parasitism in the Magellanic Horned Owl *Bubo magellanicus* (Strigiformes: Strigidae) in Chile. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 27: 161-168.

Griffin MJ, Khoo LH, Quiniou SM, O'Hear MM, Pote LM, Greenway TE & Wise DJ

2012. Genetic sequence data identifies the cercaria of *Drepanocephalus spathans* (Digenea: Echinostomatidae), a parasite of the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*), with notes on its pathology in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of Parasitology* 98: 967-972.

Guk SM, Kim JL, Park JH & Chai JY 2007. A human case of *Plagiorchis vespertilionis* (Digenea: Plagiorchiidae) infection in the Republic of Korea. *Journal of Parasitology* 93:1225-1227.

Hamann MI & González CE 2009. Larval digenetic trematodes in tadpoles of six amphibian species from northeastern Argentina. *Journal of Parasitology* 95: 623-628.

Hamann MI, Rumi A & Ostrowski de Núñez M 1993. Biological aspects about parasites and population dynamics of *Drepanotrema* spp. (Mollusca, Planorbidae) in a lentic biotope from northeastern Argentina. *Ambiente Subtropical* 3: 19-38.

Haverkost TR & Gardner SL 2008. A review of species in the genus *Rhopalias* (Rudolphi, 1819). *Journal of Parasitology* 94: 716-726.

Hebert PDN, 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: S96-S99.

Heneberg P 2020. Taxonomic comments on the validity of *Echinostoma miyagawai* Ischii, 1932 (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitology International* 74: 1-2.

Hernández-Cruz E, Hernández-Orts JS, Sereno-Urbe AL, Pérez-Ponce de León G & García-Varela M 2018. Multilocus phylogenetic analysis and morphological data reveal a new species composition of the genus *Drepanocephalus* Dietz, 1909 (Digenea: Echinostomatidae), parasites of fish-eating birds in the Americas. *Journal of Helminthology* 92: 572-595.

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 de León G 2017. Filling the gaps in the classification of the Digenea Carus, 1863: systematic position of the Proterodiplostomidae Dubois, 1936 within the superfamily Diplostomoidea Poirier, 1886, inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Systematic Parasitology* 94: 833-848.

Hernández-Mena DI, Mendoza-Garfias B, Ornelas-García CP & Pérez-Ponce de León G 2016. Phylogenetic position of *Magnivitellinum* Kloss, 1966 and *Perezitrema* Baruš & Moravec, 1967 (Trematoda: Plagiorchioidea: Macroderoididae) inferred from partial 28S rDNA sequences, with the establishment of Alloglossidiidae n. fam. *Systematic Parasitology* 93: 525-538.

Herrmann K, Poulin, R, Keeney DB & Blasco-Costa I 2014. Genetic structure in a progenetic trematode: signs of cryptic species with contrasting reproductive strategies. *International Journal for Parasitology* 44: 811-818.

Hildebrand J, Pulis EE & Tkach VV 2015. Redescription and phylogenetic relationships of the rare *Lyperosomum sarothruae* Baer, 1959 (Digenea: Dicrocoeliidae). *Acta Parasitologica* 60: 371-377.

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

Hillis DM & Dixon MT 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.

Hoffman GL & Put RE 1965. The black-spot (*Uvulifer ambloplitis*: Trematoda: Strigeoidea) of centrarchid fishes. *Transactions of the American Fisheries Society* 94: 143-151.

Hoffman GL 1956. The life cycle of *Crassiphiala bulboglossa* (Trematoda: Strigeida): development of the metacercaria and cyst, and effect on the fish hosts. *Journal of*

*Parasitology* 42: 435-444.

Hong SJ, Woo HC & Chai JY 1996. A human case of *Plagiorchis muris* (Tanabe, 1922: Digenea) infection in the Republic of Korea: freshwater fish as a possible source of infection. *Journal of Parasitology* 82: 647-649.

Horák P & Kolářová L 2011. Snails, waterfowl and cercarial dermatitis. *Freshwater Biology* 56: 779-790.

Horak P, Kolářová L & Mikeš L 2014. Schistosomatoidea and Diplostomoidea. In: Fried B & Toledo R (Eds.). *Digenetic Trematodes*. Springer, New York. pp. 331-364.

Hsu KC, Lie KJ & Basch PF 1968. The life history of *Echinostoma rodriguesi* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). *Journal of Parasitology* 54: 333-339 402.

Huffman JE & Fried B 1990. *Echinostoma* and echinostomiasis. *Advances in Parasitology* 29: 215-269.

Hughes RC 1929. Studies on the trematode family Strigeidae (Holostomidae). No. VII *Tetracotyle pipientis* Faust. *Transactions of the American Microscopical Society* 47: 42-53.

Hung GC, Chilton NB, Beveridge I, Zhu XQ, Lichtenfels JR & Gasser RB 1999. Molecular evidence for cryptic species within *Cylicostephanus minutus* (Nematoda: Strongylidae). *International Journal for Parasitology* 29: 285-291.

Hunter GW III 1933. The strigeid trematode, *Crassiphiala ambloplitis* (Hughes, 1927). *Parasitology* 25:510-517.

Huspeni TC & Lafferty KD 2004. Using larval trematodes that parasitize snails to evaluate a salt-marsh restoration project. *Ecological Applications* 14: 795-804.

Huspeni TC, Hechinger RF & Lafferty KD 2005. Trematode parasites as estuarine indicators: opportunities, applications and comparisons with conventional community approaches. In: Bortone S (ed) *Estuarine indicators*. CRC Press, Boca Raton. pp. 297-314.

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*. *Journal of Parasitology* 92: 426-429.

Jannotti-Passos LK, Souza CP, Parra JC & Simpson AJG 2001. Biparental mitochondrial DNA inheritance in the parasitic trematode *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology* 87: 79-82.

Joe LK & Basch PF 1967. The life cycle of *Paryphostomum segregatum* Dietz, 1909. *Journal of Parasitology* 53: 280-286.

Johnson PT & McKenzie VJ 2009. Effects of environmental change on helminth infections in amphibians: exploring the emergence of *Ribeiroia* and *Echinostoma* infections in North America. In: Rafael Toledo Bernard Fried (Eds.) *The Biology of Echinostomes*. Springer Nature, Switzerland. pp. 249-280.

Johnson PT, Lunde KB, Thurman EM, Ritchie EG, Wray SN, Sutherland DR & Blaustein AR 2002. Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States. *Ecological Monographs* 72: 151-168.

Johnson PT, Sutherland DR, Kinsella JM & Lunde KB 2004. Review of the trematode genus *Ribeiroia* (Psilostomidae): Ecology, life history and pathogenesis with special emphasis on the amphibian malformation problem. *Advances in Parasitology* 57: 191-253.

Johnson PT, Chase JM, Dosch KL, Hartson RB, Gross JA, Larson DJ, Sutherland DR & Carpenter R 2007. Aquatic eutrophication promotes pathogenic infection in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 15781-15786.

Johnson PT, Calhoun DM, Moss WE, McDevitt-Galles T, Riepe TB, Hallas JM & Koprivnikar J 2020. The cost of travel: How dispersal ability limits local adaptation in host-parasite interactions. *Journal of Evolutionary Biology* 34: 1-13.

Jousson O, Bartoli P & Pawlowski J 2000. Cryptic speciation among intestinal parasites (Trematoda: Digenea) infecting sympatric host fishes (Sparidae). *Journal of Evolutionary Biology* 13: 778-785.

Kanev I, Fried B & Radev V 2009. Collar spine models in the genus *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitology Research* 105: 921-927.

Katz N & Peixoto SV 2000. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33: 303-308.

Kaukas A & Rollinson D 1997. Interspecific variation within the 'hypervariable' region of the 18S ribosomal RNA gene among species of *Schistosoma* Weinland, 1858 (Digenea). *Systematic Parasitology* 36: 157-160.

Keiser J & Utzinger J 2009. Food-borne trematodiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 22: 466-483.

Kloss GR 1966. Helminthos parasitos de espécies simpátricas de *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Papéis Avulsos do Departamento de Zoologia* 18:189-219.

Kohn A, Fernandes BMN & Cohen SC 2007. South American Trematodes parasites of fishes. Editora Imprinta, Rio de Janeiro. 318 pp.

Kohn A, Moravec F, Cohen SC, Canzi C, Takemoto RM, Fernandes BMM 2011. Helminths of freshwater fishes in the reservoir of the Hydroelectric Power Station of Itaipu, Paraná, Brazil. *Check List* 7: 681-690.

Kolářová L 2007. Schistosomes causing cercarial dermatitis: a mini-review of current trends in systematics and of host specificity and pathogenicity. *Folia Parasitology* 54: 81-87.

Kostadinova A & Pérez-del-Olmo A 2014. The systematics of the Trematoda. In: Toledo R & Fried B. *Digenetic Trematodes* Springer Nature, Switzerland. 21-44pp.

Kostadinova A 2005. Family Echinostomatidae Looss, 1899. In: Jones A, Gibson DI & Bray R (Eds), *Keys to the Trematoda*. Volume 2. London, UK: CABI Publishing and The Natural History Museum. pp. 9-64.

Kostadinova A, Herniou EA, Barret J & Littlewood DTJ 2003. Phylogenetic relationships of *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) and related genera re-assessed via DNA and morphological analyses. *Systematic Parasitology* 54: 159-176.

Kostadinova A, Jones A, Bray RA & Gibson I 2005. Superfamily Echinostomatoidea Looss, 1899. In: Jones A, Gibson DI & Bray R (Eds), *Keys to the Trematoda* Vol. 2. Wallingford: CABI. 733 pp.

Kostadinova A, Vaucher C & Gibson DI 2002. Redescription of two echinostomes from birds in Paraguay, with comments on *Drepanocephalus* Dietz, 1909 and *Paryphostomum* Dietz, 1909 (Digenea: Echinostomatidae). *Systematics Parasitology* 53:147-158.

Kraus F 2009 (ed). *Alien reptiles and amphibians: a scientific compendium and analysis*. Springer, Dordrecht. 563 pp.

Krull WH 1933. Studies on the life cycle of a frog lung fluke, *Haematoloechus complexus* (Seely, 1906) Krull, n. comb. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* 6: 192-206.

Krupenko D, Gonchar A, Kremnev G, Efeykin B & Krapivin V 2020. New type of xiphidiocercariae (Digenea: Microphalloidea) from South Vietnam. *Folia Parasitologica* 67: 1-6.

Kudlai O, Stunzenas V & Tkach V 2015. The taxonomic identity and phylogenetic relationships of *Cercaria pugnax* and *C. helvetica* XII (Digenea: Lecithodendriidae) based on morphological and molecular data. *Folia Parasitologica* 62: 1-7.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C & Tamura K 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and*

*Evolution* 35:1547-1549.

Kuris AM & Lafferty KD 1994. Community structure: larval trematodes in snail hosts. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 25: 189-217.

Kuris AM 1973. Biological control: implications of the analogy between the trophic interactions of insect pest-parasitoid and snail-trematode systems. *Experimental Parasitology* 33: 365-379.

Kuris AM 1974. Trophic, interactions: similarity of parasitic castrations to parasitoids. *Quarterly Review of Biology* 49: 129-48.

La Rue GR 1957. The classification of digenetic Trematoda: a review and a new system. *Experimental Parasitology* 6: 306-349.

Lacerda AC, Takemoto R & Pavanelli GC 2009. A new trematode species parasitizing the catfish *Hoplosternum littorale* (Osteichthyes, Callichthyidae) from Paraná River, Brazil, with an emendation of the diagnosis of *Magnivittellinum* (Trematoda, Macroderoididae). *Acta Parasitologica* 54: 37-40.

Lafferty KD 1997. Environmental parasitology: what can parasites tell us about human impacts on the environment? *Parasitology Today* 13: 251-255.

Lafferty KD 1999. The evolution of trophic transmission. *Parasitology Today* 15: 111-115.

Lafferty KD & Kuris AM 2002. Trophic strategies, animal diversity and body size. *Trends in Ecology & Evolution* 17: 507-513.

Lafferty KD, Hechinger RF, Shaw JC, Whitney KL & Kuris AM 2006. Food webs and parasites in a salt marsh ecosystem. In: Collinge SK, Ray C (eds) *Disease ecology: community structure and pathogen dynamics*. Oxford University Press, Oxford. pp 119-134.

Laidemitt MR, Brant SV, Mutuku MW, Mkoji GM & Loker ES 2019. The diverse echinostomes from East Africa: with a focus on species that use *Biomphalaria* and *Bulinus* as intermediate hosts. *Acta Tropica* 193: 38-49.

Lane RL & Morris JE 2000. Biology, prevention and effects of common grubs (digenetic trematodes) in freshwater fish. Ames: Department of Animal Ecology/Iowa State University, Technical Bulletins Series 115: 1-6.

Le TH, Blair D & McManus DP 2002. Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *Trends in Parasitology* 18: 206-213.

Leakey R & Lewin R 1997. The sixth extinction: patterns of life and the future of humankind. *Journal of Leisure Research* 29: 476.

Ledwon A, Dolka B, Piasecki T, Dolka I, Szeleszczuk P 2016. Invasion of flukes of the Echinostomatidae family in racing pigeon (*Columba livia* var. domestica) Lofts. *Avian Diseases* 60: 523-527.

León-Regagnon V & Paredes CEL 2002. *Haematoloechus danbrooksi* n. sp. (Digenea: Plagiorchioidea) from *Rana vaillanti* from Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. *Journal of Parasitology* 88: 1215-1221.

León-Regagnon V & Topan J 2018. Taxonomic revision of species of *Haematoloechus* Looss, 1899 (Digenea: Plagiorchioidea), with molecular phylogenetic analysis and the description of three new species from Mexico. *Zootaxa* 4526: 251-302.

Leung T, Keeney D & Poulin R 2009. Cryptic species complexes in manipulative echinostomatid trematodes: when two become six. *Parasitology* 136: 241-252.

Li J, Zhao GH, Zou FC, Mo XH, Yuan ZG, Ai L & Zhu XQ 2010. Combined mitochondrial 16S and 12S rDNA sequences: an effective genetic marker for inter-species phylogenetic analysis of zoonotic trematodes. *Parasitology Research* 107: 561-569.

Lie KJ & Basch PF 1966. Life history of *Echinostoma barbosai* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). *Journal of Parasitology* 52: 1052-1057.

Lie KJ & Basch PF 1967. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). *Journal of Parasitology*: 1192-1199.

Lie KJ & Umathevy T. 1966. Studies on Echinostomatidae (Trematoda) in Malaya. XI. The life history of *Echinostoma hystricosum* sp. n. *Journal of Parasitology* 52: 449-453.

Lie KJ 1973. Larval trematode antagonism: principles and possible application as a control method. *Experimental Parasitology* 33: 343-349.

Lim HK & Heyneman D 1972. Intramolluscan inter-trematode antagonism: a review of factors influencing the host-parasite system and its possible role in biological control. *Advances in Parasitology* 10: 191-268.

Lima MJS, Veiga RP, Sousa LFD, Santana MBD, Oliveira MSB, Tavares-Dias M & Corrêa LL 2019. Metacercariae of *Austrodiplostomum* spp. (Digenea: Diplostomidae) infecting the eyes and brains of fish in Brazilian Amazon. *Arquivos do Instituto Biológico* 86: 1-7.

Lima WS, Soares LRM, Barçante TA, Guimarães MP & Barçante JMP 2009. Occurrence of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) infection in Brazilian cattle of Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 18: 27-30.

Littlewood DTJ 2006. The evolution of parasitism in flatworms. In: Maule AG & Marks NJ (Eds.), *Parasitic flatworms, molecular biology, immunology, and physiology*. CABI, Wallingford. 1-36 pp.

Littlewood DTJ, Bray RA & Waeschenbach A 2015. Phylogenetic patterns of diversity in cestodes and trematodes. In: Morand S, Krasnov B, Timothy D & Littlewood J. *Parasite diversity and diversification: evolutionary ecology meets phylogenetics*. Cambridge University Press, UK. pp. 304-319.

Littlewood DTJ, Rohde K & Clough KA 1997. Parasite speciation within or between host species? Phylogenetic evidence from site-specific polystome monogeneans. *International Journal for Parasitology* 27: 1289-1297.

Littlewood DTJ & Olson P 2001. Small subunit rDNA and the Platyhelminthes: signal, noise, conflict and compromise. In: Littlewood D & Bray R (Eds.). *Interrelationships of the Platyhelminthes*. CRC Press, England. 1-33 pp.

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, Drago FB, López-Hernández D, Chibwana FD, Núñez V, Van Dam A & Pinto HA 2021. Intercontinental distributions, phylogenetic position and life cycles of species of *Apharyngostrigea* (Digenea, Diplostomoidea) illuminated with morphological, experimental, molecular and genomic data. *International Journal for Parasitology* 51: 667-683.

Locke SA, McLaughlin JD, Lapierre AR, Johnson PT and 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.

Locke SA, Van Dam A, Caffara M, Pinto HA, López-Hernández D & Blanar CA 2018. Validity of the Diplostomoidea and Diplostomida (Digenea, Platyhelminthes) upheld in phylogenomic analysis. *International Journal for Parasitology* 48: 1043-1059.

Longa A, Traviezo-Valles L & Perdomo R 2010. Primer caso humano parasitado por Paramphistomidae (Trematoda: Digenea) en Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* 50: 301-306.

Looss A 1899. Weitere Beiträge zur Kenntnis der Trematodenfauna Aegyptens, zugleich Versuch einer natürlichen Gliederung des Genus *Distomum* Retzius. *Zoologische*

*Jahrbücher Abteilung für allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere* 12: 521-784.

Lopes AS, Pulido-Murillo EA, López-Hernández D, Melo AL & Pinto A 2021. First report of *Melanooides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) harboring a xiphidiocercaria in Brazil: A new parasite introduced in the Americas? *Parasitology International* 82: 1-7.

López-Caballero J, Mata-López R, Pérez Ponce de León G 2019. Molecular data reveal a new species of *Rhopalias* Stiles & Hassall, 1898 (Digenea, Echinostomatidae) in the common opossum, *Didelphis marsupialis* L. (Mammalia, Didelphidae) in the Yucatán Peninsula, Mexico. *ZooKeys* 854: 145-163.

López-Hernández D 2018. Estudo morfológico e molecular de larvas de Diplostomoidea (Trematoda: Digenea) transmitidas por moluscos dulciaquícolas em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Dissertação de Mestrado. 167 pp.

López-Hernández D, Locke AS, Assis JCA, Drago F, Melo AL, Rabelo ÉM & Pinto, H. A 2019. Molecular, morphological and experimental-infection studies of cercariae of five species in the superfamily Diplostomoidea (Trematoda: Digenea) infecting *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) in Brazil. *Acta Tropica* 199: 1-11.

López-Hernández D, Locke AS, Melo AL, Rabelo ÉML & Pinto HA 2018. Molecular, morphological and experimental assessment of the life cycle of *Posthodiplostomum nanum* Dubois, 1937 (Trematoda: Diplostomidae) from Brazil, with phylogenetic evidence of the paraphyly of the genus *Posthodiplostomum* Dubois, 1936. *Infection, Genetics and Evolution* 63: 95-103.

López-Jiménez A, Pérez-Ponce de León G & García-Varela M 2018. Molecular data reveal high diversity of *Uvulifer* (Trematoda: Diplostomidae) in Middle America, with the description of a new species. *Journal of Helminthology* 92: 725-739.

Lowe S, Browne M, Boudjelas S & Poorter M 2000. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database (Vol. 12). Auckland: Invasive Species Specialist Group. 11 pp.

Lunaschi LI & Drago FB 2005. Primer registro de *Neodiplostomum travassosi* (Digenea:

- Diplostomidae) en Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 76: 97-100.
- Lunaschi LI, Cremonete F & Drago FB 2007. Checklist of digenean parasites of birds from Argentina. *Zootaxa* 1403:1-36.
- Lunaschi LI, Drago FB & Draghi R 2015. Digeneans and acanthocephalans of birds from Formosa Province, Argentina. *Helminthologia* 52: 17-27.
- Luton K, Walker D & Blair D 1992. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology* 56: 323-327.
- Lutz A 1921. Sobre a ocorrência de *Fasciola hepatica* no estado do Rio de Janeiro. *Boletim do Instituto Oswaldo Cruz* 1: 9-13.
- Lutz A 1922. Introdução ao estudo da evolução de endotrematodes brasileiros. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 14: 95-103.
- Lutz A 1924. Estudo sobre a evolução dos endotrematodes brasileiros. Parte especial: 1. Echinostomidae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 17: 55-73.
- Lutz A 1928. Estudos sobre trematodes observados em Venezuela. In: Lutz A, Estudios de Zoología y Parasitología Venezolanas. Universidad Central de Venezuela, Caracas. pp 101-125.
- 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: 349-402.
- Machado L & Sampaio F 1980. Desenvolvimento de *Echinostoma parcespinosum* Lutz, 1924 em *Pomacea lineata* (Spix, 1827). *Naturalia* 5: 23-29.

Machado SMP, Magalhães LA, Artigas PT, Cordeiro NS & Carvalho JF 1988. Verificação de antagonismo entre larvas de *Schistosoma mansoni* e larvas de outros Digenea em *Biomphalaria tenagophila*, molusco planorbídeo de criadouro natural situado na região de Campinas, SP, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 22: 484-488.

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

Maldonado Jr A, Vieira GO, Garcia JS, Rey L & Lanfredi RM 2001. Biological aspects of a new isolate of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae): susceptibility of sympatric snails and the natural vertebrate host. *Parasitology Research* 87: 853-859.

Maldonado Jr A, Vieira GO & Lanfredi RM 2003. *Echinostoma luisreyi* n. sp. (Platyhelminthes: Digenea) by light and scanning electron microscopy. *Journal of Parasitology* 89: 800-808.

Manga-González, MY, González Lanza C, Cabanas E & Campo R 2001. Contributions to and review of dicrocoeliosis, with special reference to the intermediate hosts of *Dicrocoelium dendriticum*. *Parasitology* 123: S91-S114.

Marcogliese DJ & Cone DK 1998. Comparison of richness and diversity of macroparasite communities among eels from Nova Scotia, the United Kingdom and Australia. *Parasitology* 116: 73-83.

Marcogliese DJ 2005. Parasites of the superorganism: are they indicators of ecosystem health? *International Journal for Parasitology* 35: 705-716.

Markert JO, Oehlmann J & Roth M 1997. General Aspects of Heavy Metal Monitoring by Plants and Animals, In: Subramanian KS & Iyengar GV (Eds.), Environmental Biomonitoring - Exposure Assessment and Specimen Banking, ACS Symp. Ser. American Chemical Society, Washington, DC. pp. 19-29.

Martínez-Salazar EA, Rosas-Valdez, Gregory TR & Violante-González J 2016. Molecular phylogenetic analysis of *Infidum similis*, including morphological data and estimation of its genome size. *Journal of Parasitology* 102: 468-475.

Martorelli SR 1985. Estudios parasitológicos en biotopos lénticos de la República Argentina 1: el ciclo biológico de *Echinochasmus talaensis* sp. nov. (Digenea) parásita de *Pirangurus bolivianus* (Aves: Tyrannidae). *Neotrópica* 31: 187-200.

Martorelli SR 1986a. Estudios parasitológicos en biotopos lénticos de la República Argentina 11: el ciclo biológico de *Homalometron pseudopallidum* sp. nov. (Digenea) parásito de *Gymnogeophagus australis* (Eigenmann, 1907) (Pisces: Cichlidae) (Pisces: Cichlidae)]. *Neotrópica* 32 3-12.

Martorelli SR 1986b. Estudio sistemático y biológico de un digeneo perteneciente a la familia Microphallidae Travassos, 1920. I: *Microphallus szidati* sp. nov. parásito intestinal de *Rallus sanguinolentus sanguinolentus* (Aves: Rallidae) e *Himantopus melanurus* (Aves: Recurvirostridae) *Revista Ibérica de Parasitología* 46: 373-378.

Martorelli R 1987. Estudios parasitologicos en biotopos lenticos de la República Argentina. IV. El ciclo biologico de *Echinostoma parcespinosum* Lutz, 1924 (Digenea) parásito de *Rallus maculatus maculatus* y *Rallus sanguinolentus sanguinolentus* (Aves:Rallidae). *Revista del Museo de La Plata* 153: 47-62.

Martorelli SR 1988. El ciclo biológico de *Levinseniella cruzi* Travassos, 1920 (Digenea, Microphallidae) parásita de los ciegos cólicos de *Rollandia rolland chilensis* (Aves, Podicipedidae) e *Himantopus melanurus* (Aves, Recurvirostridae). *Iheringia* 68: 49-62.

Martorelli SR 1990. Parasitological studies in Mar Chiquita Lagoon, Buenos Aires Province, Argentina III: Cercariae belonging to the Echinostomatoidae superfamily parasitizing *Heleobia conexa* (Gaillard, 1974) (Mollusca: Hydrobiidae). *Neotropica* 36: 5-12.

Martorelli SR 1991. El ciclo biológico abreviado de *Microphallus simillimus* (Travassos, 1920), comb. N. (Digenea; Microphallidae). Parásito de *Heleobia conexa* (Mollusca,

Hydrobiidae) y de *Himantopus melanurus* (Aves; Recurvirostridae) en Argentina. *Iheringia* 71:91-98.

Martorelli SR 2003. Manual de reconocimiento de cercarias con una Introducción al conocimiento de los Digeneos: Cercarias parásitas de *Biomphalaria* spp. en el área de influencia de la represa de Salto Grande. CEPAVE. La Plata, Argentina. 120 pp.

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.

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* 13: 1-13.

Mas-Coma S, Bargues MD & Valero MA 2006. Gastrodiscoidiasis, a plant-borne zoonotic disease caused by the intestinal amphistome fluke *Gastrodiscoides hominis* (Trematoda: Gastrodiscidae). *Revista Iberica de Parasitologia* 66: 75-81.

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.

Mattos MJTD & Ueno H 1996. Prevalence of *Paramphistomum* in the bovine stomach and reticulum in the State of Rio Grande do Sul-Brazil. *Ciência Rural* 26: 273-276.

McAllister CT, Tumilson R, Robison HW & Trauth SE 2013. Initial survey on black-spot disease (Digenea: Strigeoidea: Diplostomidae) in select Arkansas fishes. *Journal of the Arkansas Academy of Science* 67: 200-203.

McAlpine DF 1997. Helminth communities in bullfrogs (*Rana catesbeiana*), green frogs (*Rana clamitans*), and leopard frogs (*Rana pipiens*) from New Brunswick, Canada.

*Canadian Journal of Zoology* 75: 1883-1890.

McMullen DB 1937. The life histories of three trematodes, parasitic in birds and mammals, belonging to the genus *Plagiorchis*. *Journal of Parasitology* 23: 235-243.

Melo AL & Pereira LH 1985. On the finding of *Biomphalaria tenagophila* naturally infected with *Schistosoma mansoni* in the state of Minas Gerais, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 27: 99-101.

Merlo MJ & Etchegoin JA 2011. Testing temporal stability of the larval digenean community in *Heleobia conexa* (Mollusca: Cochliopidae) and its possible use as an indicator of environmental fluctuations. *Parasitology* 138: 249--56.

Merlo MJ, Parietti M & Etchegoin JA 2014. Digeneos larvales de *Heleobia parchappii* y de *Heleobia australis* en ambientes dulceacuícolas y estuariales de la provincia de Buenos Aires (Argentina). *Revista Argentina de Parasitología* 2: 14-21.

Merlo MJ, Parietti M & Etchegoin JA 2017. Stunting of the penis in *Heleobia parchappii* (Mollusca: Cochliopidae) and its relationship with parasitism. *Diseases of Aquatic Organisms* 123: 81-85.

Merlo MJ, Parietti M & Etchegoin JA 2019. Temporal variations of larval digenean assemblages parasitizing *Heleobia parchappii* (Mollusca: Cochliopidae) in two shallow lakes from the Buenos Aires province, Argentina. *Iheringia Série Zoologia* 109: e2019025.

Milward-de-Andrade R 1965a. Ecologia de *Australorbis glabratus* em Belo Horizonte, Brasil. V: Infecção natural por *Cercaria macrogranulosa* Ruiz, 1952. *Revista Brasileira de Biologia* 25: 305-314.

Milward-de-Andrade R 1965b. Ecologia de *Australorbis glabratus* em Belo Horizonte, Brasil. IV - Infecções simples e mistas dos caramujos por trematódeos. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 17: 371-375.

Milward-de-Andrade R 1969. Nota ecológica sôbre o lago da Pampulha (Belo Horizonte,

MG). Com especial referência aos planorbídeos (Pulmonata, Planorbidae). *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 21: 59-116.

Mitchell AJ, Overstreet RM, Goodwin AE & Brandt TM 2005. Spread of an exotic fish-gill trematode: a far-reaching and complex problem. *Fisheries* 30: 11-16.

Miura O, Kuris AM, Torchin ME, Hechinger RF, Dunham EJ & Chiba S 2005. Molecular genetic analyses reveal cryptic species of trematodes in the intertidal gastropod, *Batillaria cumingi* (Crosse). *International Journal for Parasitology* 35: 793-780.

Mohandas A 1981. Studies on the freshwater cercariae of Kerala VII. Echinostomatid cercariae. *Proceedings: Animal Sciences* 90: 433-444.

Mohanta UK, Watanabe T, Anisuzzaman, Ohari Y & Itagaki T 2019. Characterization of *Echinostoma revolutum* and *Echinostoma robustum* from ducks in Bangladesh based on morphology, nuclear ribosomal ITS2 and mitochondrial nad1 sequences. *Parasitology International* 69: 1-7.

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

Monteiro CM, Amato JFR & 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.

Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B 2011. How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol.* 9:e1001127.

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

Morgan JA & Blair D 1998. Mitochondrial ND1 gene sequences used to identify

echinostome isolates from Australia and New Zealand. *International Journal for Parasitology* 28: 493-502.

Morley NJ & Lewis JW 2015. Thermodynamics of trematode infectivity. *Parasitology* 142: 585-597.

Morley NJ, Crane M & Lewis JW 2002. Toxicity of cadmium and zinc to encystment of *Notocotylus attenuatus* (Trematoda: Notocotylidae) cercariae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53: 129-133.

Morris MR 1976. Contribución al conocimiento del parasitismo de *Biomphalaria peregrina* (D'Orbigny) (Mollusca, Gastropoda). *Neotrópica* 22: 93-98.

Mukaratirwa S, Hove T, Cindzi ZM, Maononga DB, Taruvinga M & Matenga E 2005. First report of an outbreak of the oriental eye-fluke, *Philophthalmus gralli* (Mathis & Leger 1910), in commercially reared ostriches (*Struthio camelus*) in Zimbabwe. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 72: 203-206.

Müller G & Ueno H 1984. *Lymnaea viatrix* Orb., 1835 como hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* Lin., 1758 em Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 36: 183-190.

Müller MI, Emmerich E, Alcantara EP, Ungari LP, Ebert MB, Morais DH & Silva RJ. 2021. First molecular assessment of two digenean parasites of the lancehead snake *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Serpentes, Viperidae) in Brazil. *Parasitology Research* 120: 971-977.

Muller R & Wakelin D 2002. Worms and human disease. CABI. Vol. 2. London, UK. 300 pp.

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.

Muzzall PM, Cook V & Sweet DJ 2011. Helminths of belted kingfishers, *Megaceryle*

*alcyon* Linnaeus, 1758, from a fish hatchery in Ohio, U.S.A. *Comparative Parasitology* 78: 367-372.

Nasir P & Acuña Cedeño A 1964. Studies on freshwater larval trematodes. Part VII. Observations on a new Gymnocephalic cercaria, *C. sanlorenzensis*, from Venezuela. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 31: 267-270.

Nasir P & Acuña Cedeño A 1965. Studies on freshwater larval trematodes. Part IX. A new species of a gymnocephalic cercaria, *Cercaria sucrensis*, from Venezuela. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 32: 152-153.

Nasir P & Acuña Cedeño A 1966a. Studies on freshwater larval trematodes. Part VIII. Two new species of non-irrigulate xiphidiocercariae from Venezuela. *Zoologischer Anzeiger* 176: 291-296.

Nasir P & Acuña Cedeño A 1966b. Studies on freshwater larval trematodes. Part XIII. Some new species of cercariae from Venezuela. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 33: 96-100.

Nasir P & Díaz M 1973a Freshwater larval trematodes. XXXI. Two new species of Venezuelan cercariae. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 40: 69-73.

Nasir P & Diaz MT 1973b. Freshwater larval trematodes, XXXII. Twenty new species of Venezuelan cercariae. *Rivista di Parassitologia* 34: 1-44.

Nasir P & Díaz MT 1967. Studies on freshwater larval trematodes. XVII. The life cycle of *Echinochasmus zubeckianus* sp. n. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 30: 126-133.

Nasir P & Díaz MT 1968. Studies on freshwater larval trematodes. Part XVI. Five new species of cercariae from Venezuela. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 35: 67-74.

Nasir P & Diaz MT 1972. *Cercaria criollissima* sp. n. from a marine snail, *Melongena melongena* L., in Venezuela. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*

39: 239-242.

Nasir P & Rodriguez L 1969. Studies on freshwater larval trematodes. XX. The life cycle of *Stephanoprora paradenticulata* n. sp. (Trematoda: Echinostomatidae) *Zoologischer Anzeiger* 182: 229-244.

Nasir P & Scorza JV 1968. Studies on freshwater larval trematodes. XVIII. The life cycle of *Stephanoprora denticulata* (Rudolphi, 1802) (Trematoda: Echinostomatidae). *Zeitschrift fur Parasitenkunde* 30: 134-148.

Nasir P & Silva J 1972. Freshwater larval trematodes. XXIX. Life cycle of *Guaicaipuria parapseudoconcilia* sp. n. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 39: 142-146.

Nasir P 1960. Studies on life history of *Echinostoma nudicaudatum* n. sp. (Echinostomatidae: Trematoda). *Parasitology* 43: 833-847.

Nasir P 1961. Observations on the life cycle of *Echinostoma pinnicaudatum* n. sp. (Echinostomatidae: Trematoda). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 28: 207-212.

Nasir P 1963. Studies on freshwater larval trematodes. Part IV. A new virgulate xiphidiocercaria and another new longifurcate, faringeate, distome, furcocercaria, from Venezuela. *Zoologischer Anzeiger* 173:219-226.

Nasir P 1964a. Studies on freshwater larval trematodes. Part VI. Experimental observations on various stages in the life cycle of *Echinostoma donosoi* n. sp. (Echinostomatidae: Trematoda) from Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela* 3: 144-167.

Nasir P 1964b. Studies on freshwater larval trematodes. Part V. A new polyadenus xiphidiocercaria, *C. baldai*, from Venezuela. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 31: 28-30.

Nasir P 1965. Studies on freshwater larval trematodes. Part I. A new species of

myrocotylous xiphidiocercaria, *Cercaria cumanensis*, from Venezuela. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 32: 103-105.

Nasir P 1971. Freshwater larval trematodes. XXVIII. Three new species of cercariae. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 38: 206-210.

Nasir P 1982. Freshwater larval trematodes. XXXVII. Two new species of non-virgulate xiphidiocercariae, parasitic in *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848). *Rivista di Parassitologia* 43: 121-129.

Nasir P 1986. North American freshwater xiphidiocercariae. Edificio Rectorado, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 233 pp.

Nasir P, Díaz MT & Lemus de Guevara D 1969. Studies on freshwater larval trematodes. Part XIX. Two new species of gymnocephalic cercariae from Venezuela. *Zoologischer Anzeiger* 181: 427-434.

Nasir P, Díaz MT & Marcano DG 1967. Freshwater larval trematodes. XXVI. Life cycle of *Guaicaipuria pseudoconcilia* comb, n., gen. n., subfam. n. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 38: 190-193.

Nasir P, Gonzalez G & Díaz MT 1972. Freshwater larval trematodes XXX. Life cycle of *Petasiger novemdeeim* Lutz, 1928. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 39: 162-168.

Nasir P, Hamana LJ & Diaz 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.

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

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

Niewiadomska K & Pojmanska T 2011. Multiple strategies of digenean trematodes to complete their life cycles. *Wiadomości Parazytologiczne* 57: 233-241.

Nolan MJ & Crib TH 2006. An exceptionally rich complex of Sanguinicolidae von Graff, 1907 (Platyhelminthes: Trematoda) from Siganidae, Labridae and Mullidae (Teleostei: Perciformes) from the Indo-west Pacific Region. *Zootaxa* 1218: 1-80.

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.

O'Hear M, Pote L, Yost M, Doffitt C, King T, Panuska C 2014. Morphologic and molecular identifications of digenetic trematodes in doubled-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) from Mississippi Delta, USA. *Journal of Wildlife Diseases* 50:42-49.

Ohlweiler FP, Eduardo JM, Takahashi FY, Crein GA, Luca L R & 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: 1-12.

Oliveira SM, Fujii TU, Spósito Filha E & Martins AMCRPF 2002. Ocorrência de *Lymnaea columella* Say, 1817 infectada naturalmente por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) no vale do Ribeira, São Paulo, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico* 69: 29-37.

Olivier L 1940. Life history studies on two strigeid trematodes of the Douglas Lake region, Michigan. *Journal of Parasitology* 26: 447-477.

Olson PD & Tkach VV 2005. Advances and trends in the molecular systematics of the parasitic Platyhelminthes. *Advances in Parasitology* 60: 165-243.

Olson PD, Cribb TH, Tkach VV, Bray RA & Littlewood DTJ 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology* 33: 733-755.

Olson PD, Littlewood DTJ, Bray RA & Mariaux J 2001. Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 443-467.

Onaca F, Graça R, Fabrin T, Takemoto R & Oliveira A 2020. Molecular characterization and identification of digenean larval stages in *Aylacostoma chloroticum* (Prosobranchia: Thiaridae) from a neotropical floodplain. *Journal of Helminthology* 94: E73.

Ostrowski de Núñez M 1968. Estudios sobre la fauna parasitaria del biguá, *Phalacrocorax olivaceus*. I. Trematodos pertenecientes a las familias Cathaemasidae y Echinostomatidae. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Parasitología* 1: 131-152.

Ostrowski de Núñez M & Quintana MG 2008. The life cycle of *Stephanoprora aylacostoma* n. sp. (Digenea: Echinostomatidae), parasite of the threatened snail *Aylacostoma chloroticum* (Prosobranchia, Thiaridae), in Argentina. *Parasitology Research* 102: 647-655.

Ostrowski de Núñez M 1973. 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 1974. Fauna de agua dulce de la República Argentina. III. Cercarias de la superfamilia Plagiorchioidea (Trematoda). *Neotrópica* 20: 1-8.

Ostrowski de Núñez M 1979. Ungewöhnliche Xiphidiocercarie aus *Ampullaria canaliculata* nebst Bemerkungen über *Travtrema stenocotyle* *Angewandte Parasitologie* 20: 46-52.

Ostrowski de Núñez M 1981a. Trematodos larvales de Venezuela. Cercarias pertenecientes a la superfamilia Echinostomatoidea. *Annales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México* 52: 51-62.

Ostrowski de Núñez M 1981b. Fauna de agua dulce de la República Argentina. X. Cercarias de las superfamilias Echinostomatoidea, Allocreadioidea y Microphaloidea (Trematoda, Digenea). *Comunicaciones del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia* 2: 1-9.

Ostrowski de Núñez M 1982. Tremátodos larvales de Venezuela. Cercarias pertenecientes a la superfamilia Plagiorchioidea. *Annales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México* 52: 27-38.

Ostrowski de Núñez M 1992. Trematoda. Familias Strigeidae, Diplostomidae, Schistosomatidae, Spirorchiidae y Bucephalidae. *Fauna de Agua Dulce de la República Argentina. PROFADU (CONICET), Bueno Aire*. 55 pp.

Ostrowski de Núñez M 2007. Life cycle of *Stephanoprora uruguayense* (Digenea: Echinostomatidae) in Argentina. *Journal of Parasitology* 93: 1090-1096.

Ostrowski de Núñez M & Hamann MI 2013. Trematodes digeneos larvales que parasitan *Biomphalaria* spp., y otros moluscos pulmonados en la República Argentina. IN: Moluscos de interés sanitario en la Argentina Salomón OD, Manzur JL & Yedlin GE. 1a ed. Puerto Iguazu: INMeT. 157 pp.

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

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

Ostrowski de Núñez M, Hamann MI, Rumi A 1997. Study of larval trematodes in *Biomphalaria* spp. (Mollusca, Planorbidae) from San Roque, Corrientes province, Argentina. *Physis* 54: 7-15.

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.

Otranto D, Rehbein S, Weigl S, Cantacessi C, Parisi A, Lia RP & Olson PD 2007. Morphological and molecular differentiation between *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) and *Dicrocoelium chinensis* (Sudarikov and Ryjikov, 1951) tang and tang, 1978 (Platyhelminthes: Digenea). *Acta Tropica* 104: 91-98.

Pante E, Schoelink C & Puillandre N 2015. From integrative taxonomy to species description: one step beyond. *Systematic Biology* 64: 152-160.

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

Parietti M, Merlo MJ & Etchegoin JA 2013. Can the studies at a spatial scale of 100s meters detect the spatiotemporal fluctuations of a parasite assemblage? *Acta Parasitologica* 58: 577-584.

Parietti M, Merlo MJ & Etchegoin JA 2015. Larval digenean stages (Trematoda) that parasited *Biomphalaria peregrina*, D'Orbigny, 1835 (Mollusca, Planorbidae) in the Southeast of the Buenos Aires province (Argentina). *Revista Argentina de Parasitologia* 3:10-17.

Parietti M, Merlo MJ & Etchegoin JA 2020. Spatio-temporal variations in larval digenean assemblages of *Heleobia parchappii* (Mollusca: Cochliopidae) inhabiting four human-impacted streams. *Journal of Helminthology* 94: E137.

Paviotti-Fischer E, Lopes-Torres EJ, Santos MAJ, Brandolini SVPB & Pinheiro J 2019. Xiphidiocercariae from naturally infected *Lymnaea columella* (Mollusca, Gastropoda) in urban area: morphology and ultrastructure of the larvae and histological changes in the mollusc host. *Brazilian Journal of Biology* 79: 446-451.

Pearson JC 1961. Observations on the morphology and life cycle of *Neodiplostomum intermedium* (Trematoda: Diplostomatidae). *Parasitology* 51: 133-172.

Pelegriani LS, Gião T, Vieira DHMD, Müller MI, Silva RJ, Pérez-Ponce de León & Abdallah VD 2019. Molecular and morphological characterization of the metacercariae of two species of diplostomid trematodes (Platyhelminthes, Digenea) in freshwater fishes of the Batalha River, Brazil. *Parasitology Research* 118: 2169-2182.

Pérez-Ponce de León G 2001. The diversity of digeneans (Platyhelminthes: Cercomeria: Trematoda) in vertebrates in Mexico. *Comparative Parasitology* 68: 1-8.

Pérez-Ponce de León G, Razo-Mendivil U, Mendoza-Garfias B, Rubio-Godoy M & Choudhury A 2015. A new species of *Wallinia* Pearse, 1920 (Digenea: Allocreadiidae) in *Astyanax mexicanus* (Characidae) from Mexico revealed by morphology and sequences of the 28S ribosomal RNA gene. *Folia Parasitologica* 62: 018.

Petrochenko VI & Kotelnikov GA 1963. Helminthoses of birds. Gel'mintozy ptits. Moscow, Russia. 248 pp.

Pietroock M, Marcogliese DJ & McLaughlin D 2002. Effects of cadmium upon longevity of *Diplostomum* sp. (Trematoda: Diplostomidae) cercariae. *Chemosphere* 47: 29-33.

Pimm S, Raven P, Peterson A, Sekercioglu CH & Ehrlich PR 2006. Human impacts on the rates of recent, present, and future bird extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103:10941-10946.

Pinto HA 2013. Biologia e taxonomia de trematódeos transmitidos por moluscos dulciaquícolas na represa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Tese de Doutorado. 300 pp.

Pinto HA & Melo AL 2010. *Melanoides tuberculata* as intermediate host of *Philophthalmus gralli* in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 52: 323-327.

Pinto HA & Melo AL 2012a. Metacercariae of *Renifer heterocoelium* (Trematoda: Reniferidae) in tadpoles of *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) in Brazil. *Revista Mexicana de Biodiversidade* 83: 553-556.

Pinto HA & Melo AL 2012b. *Physa marmorata* (Mollusca: Physidae) as intermediate host of *Echinostoma exile* (Trematoda: Echinostomatidae) in Brazil. *Neotropical Helminthology* 6: 291-299.

Pinto HA & Melo AL 2012c. Infecção natural de *Poecilia reticulata* (Actinopterygii: Poeciliidae) por metacercárias na Represa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca* 38: 257-264.

Pinto HA & Melo AL 2013a. Larvas de trematódeos em moluscos do Brasil: panorama e perspectivas após um século de estudos. *Revista de Patologia Tropical* 42: 369-386.

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

Pinto HA, Mati VLT & Melo AL 2012a. Dermatite cercariana por esquistossomatídeos de aves: é possível a ocorrência de casos no Brasil? *Revista de Patologia Tropical* 42: 1-14.

Pinto HA, Mati VLT & Melo AL 2012b. New hosts and localities for trematodes of snakes (Reptilia: Squamata) from Minas Gerais State, Southeastern Brazil. *Comparative Parasitology* 79: 238-246.

Pinto HA, Mahecha GAB & Melo AL 2013a. *Petasiger* Dietz, 1909 (Trematoda: Echinostomatidae) in Birds and Mollusks from Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 22: 427-432.

Pinto HA, Jadin RC, Orlofske SA, Johnson PT & Melo AL 2013b. *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) as an intermediate host of *Ribeiroia* sp. (Trematoda: Psilostomidae) in Brazil. *Journal of Parasitology* 99: 914-918.

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, Cantanhede SPD, Thiengo SC, Melo AL & Fernandez MA 2015c. The apple snail *Pomacea maculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) as the intermediate host of *Stomylotrema graciosus* (Trematoda: Stomylotrematidae) in Brazil: the first report of a mollusc host of a stomylotrematid trematode. *Journal of parasitology* 101: 134-139.

Pinto HA, Griffi 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, Braga RR, Mati VL, Melo AL & Tkach VV 2017. DNA sequences confirm low specificity to definitive host and wide distribution of the cat pathogen *Platynosomum illiciens* (= *P. fastosum*) (Trematoda: Dicrocoeliidae). *Parasitology Research* 117: 1975-1978.

Pinto HA, Goncalves N, López-Hernández D, Pulido-Murillo EA & Melo AL 2018. The life cycle of a zoonotic parasite reassessed: Experimental infection of *Melanooides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) with *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae). *PLoS One* 13: e0194161-13

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 2014. *Parasite Biodiversity*. Smithsonian Institution, Washington DC. 216 pp.

Poulin R & Mouritsen KN 2006. Climate change, parasitism and the structure of intertidal ecosystems. *Journal of Helminthology* 80: 183-191.

Puillandre N, Brouillet S & Achaz G 2021. ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources* 21: 609-620.

Pulis EE, Tkach V & Newman RA 2011. Helminth parasites of the wood frog, *Lithobates sylvaticus*, in prairie pothole wetlands of the Northern Great Plains. *Wetlands* 31: 675-685.

Queiroz MS, López-Hernández D, Locke SA, Pinto HA & Anjos LA 2019. Metacercariae of *Heterodiplostomum lanceolatum* (Trematoda: Proterodiplostomidae) found in *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae) from Brazil: a morphological, molecular and ecological study. *Journal of Helminthology* 94: 1-8.

Queiroz MS, Alves PV, López-Hernández D, Anjos LA & Pinto HA 2021. Exploring Neotropical anuran parasites: a morphological, life cycle and phylogenetic study of *Catadiscus marinholti* (Trematoda: Diplostidae). *Parasitology* 148: 798-808.

Quintão e Silva M & Costa HM 1999. Helminths of white-bellied opossum from Brazil. *Journal of Wildlife Diseases* 35: 371-374.

Radev V, Gardner SL & Kanev I 2005. Family Rhopalidae Looss, 1899. In: A Jones, RA Bray, and DI Gibson (eds). Keys to the Trematoda. CAB International, The Natural History Museum London, U.K. pp. 119-120.

Rathinam SR, Usha KR & Rao NA 2002. Presumed trematode-induced granulomatous anterior uveitis: a newly recognized cause of intraocular inflammation in children from south India. *American Journal of Ophthalmology* 133: 773-779.

Rezende HEB, Araújo JLB, Gomes PAC, Nuernberg S, Neto MP, Oliveira G & Mello RP 1973. Notas sobre duas espécies de *Lymnaea* Lamarck, 1799, hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica* no Estado do Rio de Janeiro. *Arquivo da Universidade Rural Rio de Janeiro* 3: 21-23.

Rietschel G & Werding B 1978. Trematodes of birds from Northern Columbia. *Parasitology Research* 57: 57-82.

Rohde K 2001. The Aspidogastrea: an archaic group of Platyhelminthes. In: Littlewood DTJ & Bray RA (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London, pp. 159-167.

Rohde K 2002 Subclass Aspidogastrea Faust & Tang, 1936. In: Gibson DI, Jones A & Bray RA (Eds.), *Keys to the Trematoda*. Vol. 1. CABI, Wallingford. pp. 5-14.

Rohde K 2005 Helminth parasites. In: Rohde, K. (Ed.), *Marine Parasitology*. CABI, Wallingford, pp. 47-116.

Rojas D, Soto C & Rojas A 2013. Pathology and first report of natural eye infection with the trematode *Philophthalmus gralli* (Digenea, Philophthalmidae) in *Tinamus major* (Tinamiformes, Tinamidae), Costa Rica. *Parasitology International* 62: 571-574.

Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S & Huelsenbeck JP 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61: 539-542.

Ruehle B & Poulin R 2020. Risky business: influence of eye flukes on use of risky microhabitats and conspicuousness of a fish host. *Parasitology Research* 119: 423-430.

Ruiz JM 1943. Contribuição ao estudo das formas larvárias de trematóides brasileiros. *Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo* 3:105-112.

Ruiz JM 1952a. Contribuição ao estudo das formas larvárias de trematódeos brasileiros. 2. Fauna de Santos, est. de S. Paulo. *Memórias do Instituto Butantan* 24: 17-36.

Ruiz JM 1952b. Contribuição ao estudo das formas larvárias de trematódeos brasileiros. 3. Fauna de Belo Horizonte e Jaboticatubas, estado de Minas Gerais. *Memórias do Instituto Butantan* 24: 45-62.

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.

Ryang YS, Ahn YK, Kim WT, Shin KC, Lee KW & Kim TS 1986. Two cases of human infection by *Echinostoma cinetorchis*. *Korean Journal of Parasitology* 24: 71-76.

Sah R, Khadka S, Hamal R & Poudyal S 2018. Human echinostomiasis: a case report. *BMC Research Notes* 11: 1-6.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Santoro M, Morales JA & Rodríguez-Ortiz B. 2007. Spirorchiidiosis (Digenea: Spirorchiidae) and lesions associated with parasites in Caribbean green turtles (*Chelonia mydas*). *Veterinary Record* 161: 482-486.

Schafranski NL, Freitas MG & Costa JO 1975. Ciclo biológico de *Typhlocoelum cucumerinum* (Rudolph, 1809) (Trematoda, Cyclocoelidae). *Revista Brasileira de Biologia* 35: 519-526.

Schell SC 1965. The life history of *Haematoloechus breviplexus* Stafford, 1902 (Trematoda: Haplometridae McMullen, 1937), with emphasis on the development of the sporocysts. *Journal of Parasitology* 51: 587-593.

Schell SC 1975. The life history of *Plagioporus shawi* (McIntosh 1939) (Trematoda: Opecoelidae), an intestinal parasite of salmonid fishes. *Journal of Parasitology* 61: 899-905.

Schotthoefer AM, Bolek MG, Cole RA & Beasley VR 2009. Parasites of the mink frog (*Rana septentrionalis*) from Minnesota, USA. *Comparative Parasitology* 76: 240-246.

Schwelm J, Kudlai O, Smit N J, Selbach C & Sures B 2020. High parasite diversity in a neglected host: larval trematodes of *Bithynia tentaculata* in Central Europe. *Journal of Helminthology* 94: 1-23.

Scott ME 1984. Helminth community in the belted kingfisher, *Ceryle alcyon* (L.) in southern Québec. *Canadian Journal of Zoology* 62: 2670-2681.

Selbach C, Soldánová M, Georgieva, Kostadinova A, Kalbe M & Sures M 2014. Morphological and molecular data for larval stages of four species of *Petasisiger* 1909 (Digenea: Echinostomatidae) with an updated key to the known cercariae from the Palaearctic. *Systematic Parasitology* 89: 153-166.

Sereno-Uribe AL, Gómez LA, Ostrowski de Núñez M, Pérez-Ponce de León G & García-Varela M 2019. Assessing the taxonomic validity of *Austrodiplostomum* spp. (Digenea: Diplostomidae) through nuclear and mitochondrial data. *Journal of Parasitology* 105: 102-112.

Shchenkov SV, Denisova SA, Kremnev GA & Dobrovolskij AA 2020. Five new morphological types of virgulate and microcotylous xiphidiocercariae based on morphological and molecular phylogenetic analyses. *Journal of Helminthology* 94: 1-12.

Shea J, Kersten GJ, Puccia CM, Stanton AT, Stiso SN, Helgeson ES & Back EJ 2012. The use of parasites as indicators of ecosystem health as compared to insects in freshwater lakes of the Inland Northwest. *Ecological Indicators* 13: 184-188.

Silva RD, Rodrigues RR, Stein MFB, Sipoli GPM, Pinhão R & Lopes CAM 1999. The detection of *Ochetosoma heterocoelium* (Travassos, 1921) (Trematoda: Digenea: Ochetosomatidae) in *Chironius exoletus* (Linnaeus, 1758) (Ophidia: Colubridae). *Journal of Venomous Animals and Toxins* 5: 85-90.

Silva RE Melo AL 2013. Caracterização de larvas de trematódeos emergentes de moluscos de água doce coletados na bacia hidrográfica do Lago Soledade, Ouro Branco, Minas Gerais, Brasil. *Lundiana* 11: 21-33.

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

Snyder SD & Tkach VV 2001. Phylogenetic and biogeographical relationships among some holarctic frog lung flukes (Digenea: Haematoloechidae). *Journal of Parasitology* 87: 1433-1440.

Snyder SD & Janovy Jr J 1994. Second intermediate host-specificity of *Haematoloechus complexus* and *Haematoloechus medioplexus* (Digenea: Haematoloechidae). *Journal of Parasitology* 80: 1052-1055.

Sokolov SG & Shchenkov SV 2017. Phylogenetic position of the family Orientocreadiidae within the superfamily Plagiorchioidea (Trematoda) based on partial 28S rDNA sequence. *Parasitology Research* 116: 2831-2844.

Sokolov SG, Lebedeva DI, Shchenkov SV & Gordeev II 2020. *Caudotestis dobrovolski* n. sp. (Trematoda, Xiphidiata) in North Pacific scorpaeniform fish: A crisis of concept of the opecoelid subfamily Stenakrinae Yamaguti, 1970. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 58: 1111-1122.

Soldánová M & Kostadinova A 2011. Rapid colonisation of *Lymnaea stagnalis* by larval trematodes in eutrophic ponds in central Europe. *International Journal for Parasitology* 41: 981-990.

Soldánová M, Selbach C, Kalbe M, Kostadinova A, Sures B 2013. Swimmer's itch: etiology, impact, and risk factors in Europe. *Trends in Parasitology* 29: 65-74.

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 MA & Melo AL 2012. Characterization of larval trematodes emerging from gastropod mollusks collected in Mariana, Minas Gerais, Brazil. *Iheringia. Série Zoológica*

102: 11-18.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M & Utzinger J 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infectious Diseases* 6: 411-425.

Stieglitz WO & Klimstra WD 1962. Dietary pattern of the Virginia opossum, *Didelphis virginianus* Kerr, late summer-winter, Southern Illinois. *Transactions of the Illinois Academy of Science* 55: 198-208.

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.

Suhardono, JA, Roberts & Copeman DB 2006. Optimization of the procedure for counting the eggs of *Fasciola gigantica* in bovine feces. *Tropical Animal Health and Production* 38: 383-387.

Sures B 2008. Host-parasite interactions in polluted environments. *Journal of Fish Biology* 73: 2133-2142.

Szidat L 1963. On South American Cyclocoelidae (Trematoda, Digenea) with a contribution on their ecology.] *Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia* 9: 27-36.

Szuroczki D, Vesprini ND, Jones TR, Spencer GE & Carlone RL 2012. Presence of *Ribeiroia ondatrae* in the developing anuran limb disrupts retinoic acid levels. *Parasitology Research* 110: 49-59.

Tatonova YV, Izrilskaia AV & Besprozvannykh VV 2020. *Stephanoprora amurensis* sp. nov., *Echinochasmus milvi* Yamaguti, 1939 and *E. suifunensis* Besprozvannykh, 1991 from the Russian southern Far East and their phylogenetic relationships within the Echinochasmidae Odhner 1910. *Parasitology* 147: 1469-1479.

Tavela AO, Carretta Junior M, Oliveira R, Carneiro FT, Silva VHD, Braga FR & Paula TAR 2014. Parasitism by *Paratanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae) in common waxbill (*Estrilda astrild*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 66: 1276-1280.

Thatcher V 1963. Studies on the trematodes of the Mexican indigo snake (*Drymarchon corais melanurus*) with descriptions of two new species. *Transactions of the American Microscopical Society* 82: 371-380.

Thatcher VE 2006. Amazon Fish Parasites. 2nd ed. Sofia-Moscow, Pensoft Publishers. 508 pp.

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.

Tkach V, Pawlowski J & Mariaux J 2000. Phylogenetic analysis of the suborder Plagiorchiata (Platyhelminthes, Digenea) based on partial 18S rDNA sequences. *International Journal for Parasitology* 30: 83-93.

Tkach V, Pawlowski J, Mariaux J, Swiderski Z, Littlewood DTJ & Bray RA 2001. Molecular phylogeny of the suborder Plagiorchiata and its position in the system of Digenea. In: Littlewood DTJ & Bray RA (eds). *Interrelationships of the Platyhelminthes*. CRC Press, New York. pp. 186-193.

Tkach VV 2008. Family Haematoloechidae Freitas and Lent, 1939. In: Bray R, Gibson D & Jones A. *Keys to the Trematoda Vol. 3*. Wallingford: CABI, UK. Pp. 361-366.

Tkach VV, Achatz TJ, Pulis EE, Junker K, Snyder SD, Bell JA & Melo FTV. 2020. Phylogeny and systematics of the Proterodiplostomidae Dubois, 1936 (Digenea: Diplostomoidea) reflect the complex evolutionary history of the ancient digenean group. *Systematic Parasitology* 97: 409-439.

Tkach VV, Kudlai O & Kostadinova A 2016. Molecular phylogeny and systematics of the Echinostomatoidea Looss, 1899 (Platyhelminthes: Digenea). *International Journal for Parasitology* 46: 171-185.

Tkach VV, Littlewood DTJ, Olson PD, Kinsella J & Swiderski Z 2003. Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). *Systematic Parasitology* 56: 1-15.

Toledo R & Esteban JG 2016. An update on human echinostomiasis. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 110:37-45.

Toledo LF, Ribeiro RS, Haddad CFB 2007. Anurans as prey: an exploratory analysis and size relationships between predators and their prey. *Journal of Zoology* 271: 170-177.

Travassos L & Artigas P 1927. *Pneumonoeces neivai* n. sp.; trematódeo do pulmão de rã. *Boletim Biologico* 10: 212-214.

Travassos L 1921. Contribuições para o conhecimento da fauna helmintológica brasileira. XII. Sôbre as espécies brasileiras da subfamília Brachycoelinae. *Archivos da Escola Superior de Agricultura e Medicina Veterinária* 5: 59-67.

Travassos L 1939. Um novo trematodeo parasito de garças: *Ribeiroia insignis* n. g., n. sp. *Boletim Biologico* 4: 301-304.

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

Ueta MT 1980. Ocorrência de infecção natural de *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 em *Lymnaea columella* Say, 1817 no vale do Paraíba, SP, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 14: 230-233.

Ulmer MJ 1970. Studies on the helminth fauna of Iowa. I. Trematodes of amphibians. *American Midland Naturalist* 83: 38-64.

Valadão MC, López-Hernández D, Alves PV & Pinto HA 2022. A new species of

*Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) from the 'revolutum' group found in Brazil: refuting the occurrence of *Echinostoma miyagawai* (= *E. robustum*) in the Americas. *Parasitology* 149: 325-336.

Valerio CE 1969. A gran capacidad adaptiva del zorro pelon (*Didelphis marsupialis* Linn). *Revista de la Universidad de Costa Rica* 26: 43-44.

Van Haitsma JP 1925. *Crassiphiala bulboglossa*, nov. gen., nov. spec., a holostomatid trematode from the belted kingfisher, *Ceryle alcyon* Linn. *Transactions of the American Microscopical Society* 44: 121-131.

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. *Iheringia, Série Zoológica* 60: 3-12.

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.

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

Velásquez LE & Escobar JS 2001. *Physa cubensis* Pfeiffer, 1839 (Pulmonata: Physidae) en la sabana de Bogotá (Cundinamarca, Colombia). *Actualidades Biológicas* 23: 75-80.

Vergara D & Velásquez LE 2009. Larval stages of digenea from *Melanoides tuberculata* (Gastropoda: Thiariidae) in Medellín, Colombia. *Acta Biológica Colombiana* 14: 135-142.

Vidal-Martínez VM 2007. Helminths and protozoans of aquatic organisms as bioindicators of chemical pollution. *Parassitologia* 49: 177-184.

Vidal-Martínez VM, Pech D, Sures B, Poulin R & Purucker T 2010. Can parasites really

reveal environmental impact? *Trends in Parasitology* 26: 44-51.

Wagner BA, Hoberg EP, Somers CM, Soos C, Fenton H & Jenkins EJ 2012. Gastrointestinal helminth parasites of double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) at four sites in Saskatchewan, Canada. *Comparative Parasitology* 79: 275-282.

Wesolowska W & Wesołowski T 2014. *Leucochloridium* sporocysts manipulate the behaviour of their snail hosts? *Journal of Zoology* 292: 151-155.

Will KW, Mishler BD & Wheeler QD 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 54: 844–851.

Wilson WD, Johnson PT, Sutherland DR, Moné H & Loker ES 2005. A molecular phylogenetic study of the genus *Ribeiroia* (Digenea): Trematodes known to cause limb malformations in amphibians. *Journal of Parasitology* 91: 1040-1045.

Yamaguti S 1971. Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates. Keigaku Publishing Co. Tokyo, Keigaku, pp 529-533.

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 pp.

Yu SH & Mott KE 1994. Epidemiology and morbidity of food-borne intestinal trematode infections. *Tropical Diseases Bulletin* 91: R125-R150.

Zhao QP, Jiang MS, Dong HF & Nie P 2012. Diversification of *Schistosoma japonicum* in mainland China revealed by mitochondrial DNA. *PLoS neglected tropical diseases* 6: e1503.

## ANEXO 1: RESUMO DAS ANÁLISES

TABELA 1- Dados das análises morfológicas e moleculares realizadas nas diferentes

Larvas do presente estudo	Análise morfológica	I.E	Marcadores moleculares			
			28S	<i>Nad-1</i>	ITS	<i>Cox-1</i>
ECHINOSTOMATOIDEA						
<b>Echinochasmidae gen. sp.</b>	✓	✓	✓	-	✓	-
<i>Drepanocephalus spathans</i>						
Belo Horizonte	✓	-	✓	✓	-	-
Contagem	⊗	-	✓	✓	-	-
<b>Neopetasiger sp.</b>			✓	✓	-	-
Belo Horizonte	✓	-	✓	✓	-	-
Betim	⊗	-	✓	✓	-	-
Contagem	⊗	-	✓	✓	-	-
<b>Echinostomatidae sp. 1</b>						
Belo Horizonte	✓	-	✓	✓	✓	-
Maranhão	-	-	⊗	✓	-	-
Betim	-	-	✓	⊗	-	-
Contagem	-	-	✓	⊗	-	-
<b>Echinostomatidae sp. 2</b>	✓	✓	✓	✓	-	-
<b>Echinostomatidae sp. 3</b>	✓	✓	✓	✓	-	-
<b>Echinostomatidae sp. 4</b>	✓	-	✓	✓	-	-
<b>Echinostomatidae sp. 5</b>	✓	-	⊗	⊗	-	-
<b>Rhopalias sp. 1</b>	✓	-	✓	✓	✓	✓
<b>Rhopalias sp. 2</b>	✓	-	✓	✓	✓	✓
<b>Rhopalias sp. 3</b>	✓	-	✓	✓	✓	⊗
<b>Ribeiroia sp.</b>						
Belo Horizonte	✓	-	✓	⊗	✓	✓
Contagem	⊗	-	⊗	⊗	⊗	⊗
Rio de Janeiro	⊗	-	⊗	⊗	✓	⊗
Frutal	⊗	-	⊗	⊗	✓	⊗
PLAGIORCHIOIDEA						
<b>Haematoloechus sp.</b>	⊗	-	✓	-	✓	⊗
<b>Magnivitellinum sp.</b>	✓	-	✓	-	⊗	-
<b>Haematoloechidae gen. sp.</b>	✓	-	✓	-	✓	-
<b>Plagiorchioidea gen. sp.</b>	✓	-	✓	-	✓	-
<b>Renifer sp.</b>	✓	-	✓	-	✓	✓
DIPLOSTOMOIDEA						
<b>Crassiphiala sp.</b>	⊗	✓	✓	-	✓	✓
<b>Diplostomidae gen. sp.</b>	✓	-	✓	-	✓	✓
<b>Apharyngostrigea pipientis</b>	✓	-	-	-	✓	✓

larvas do presente estudo.

**Legenda:** ✓ dados obtidos, ⊗ amostras nas quais não foi possível obter sequências, ⊗ amostras exclusivamente para biologia molecular, - quando não foi necessário gerar alguma sequência, I.E.: Infecção experimental.

## ANEXO 2: TABELAS DE DIVERGÊNCIAS

TABELA 1- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene 28s de *Echinochasmidae* gen. sp. obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Echinostomatoidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	<b>Echinochasmidae gen. sp.</b>																			
2	<i>Echinochasmidae</i> sp. MH532427 AR	1,0																		
3	<i>Echinochasmidae</i> sp. MH532428 AR	2,8	2,4																	
4	<i>Echinochasmidae</i> sp. MH532429 AR	1,0	0,0	2,4																
5	<i>Echinochasmus beleocephalus</i> KT956929 UC	4,0	3,6	4,2	3,6															
6	<i>Echinochasmus coaxatus</i> KJ542643 UC	5,0	4,6	5,3	4,6	1,7														
7	<i>Echinochasmus coaxatus</i> KT956928 UC	4,5	4,2	4,6	4,2	1,3	0,4													
8	<i>Echinochasmus donaldsoni</i> KT956930 EUA	5,9	5,7	6,1	5,7	6,2	6,8	6,7												
9	<i>Echinochasmus milvi</i> KT873317 RUS	6,1	5,8	6,3	5,8	6,2	7,0	7,0	2,4											
10	<i>Echinochasmus</i> sp. 1 MN726947 LT	5,6	5,6	6,1	5,6	6,4	6,6	6,8	2,4	1,5										
11	<i>Echinochasmus</i> sp. 2 MN726948 AL	4,2	3,8	4,4	3,8	0,2	1,9	1,5	6,4	6,2	6,4									
12	<i>Echinochasmus</i> sp. LC599526 JP	6,1	5,8	6,3	5,8	6,2	7,0	7,0	2,4	0,0	1,5	6,2								
13	<i>Echinochasmus</i> sp. MN726946 AL	5,6	5,6	6,1	5,6	6,4	6,6	6,8	2,4	1,5	0,0	6,4	1,5							
14	<i>Echinochasmus suifunensis</i> MT447057 RUS	6,1	5,8	6,3	5,8	6,2	7,0	7,0	2,4	0,0	1,5	6,2	0,0	1,5						
15	<i>Echinochasmus japonicus</i> JQ890579 VNM	4,1	3,9	4,6	3,9	0,5	2,0	1,6	5,7	6,1	6,1	0,7	6,1	6,1	6,1					
16	<i>Echinochasmus milvi</i> KT873316 RUS	6,1	5,8	6,3	5,8	6,2	7,0	7,0	2,4	0,0	1,5	6,2	0,0	1,5	0,0	6,1				
17	<i>Echinochasmus milvi</i> KT873318 RUS	6,1	5,8	6,3	5,8	6,2	7,0	7,0	2,4	0,0	1,5	6,2	0,0	1,5	0,0	6,1	0,0			
18	<i>Echinochasmus milvi</i> KT873319 RUS	6,1	5,8	6,3	5,8	6,2	7,0	7,0	2,4	0,0	1,5	6,2	0,0	1,5	0,0	6,1	0,0	0,0		
19	<i>Echinochasmus mordax</i> KT956931 UC	5,1	4,9	5,4	4,9	5,4	6,2	5,7	1,5	2,2	2,0	5,6	2,2	2,0	2,2	4,9	2,2	2,2	2,2	
20	<i>Echinochasmus</i> sp. JQ088098 LT	5,4	5,0	5,5	5,0	5,8	6,5	6,2	1,4	1,7	1,7	6,0	1,7	1,7	1,7	5,4	1,7	1,7	1,7	1,0

TABELA 2- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais da região transcrita interna 1 (ITS1) de Echinochasmidae gen. sp. obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Echinostomatoidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	<b>Echinochasmidae gen. sp.</b>																				
2	Echinochasmidae sp. MH532423 AR	5,4																			
3	Echinochasmidae sp. MH532422 AR	2,5	6,5																		
4	Echinochasmidae sp. MH532421 AR	2,7	6,5	0,0																	
5	<i>Drepanocephalus spathans</i> KP053260 BR	19,0	20,0	19,7	19,8																
6	<i>Drepanocephalus mexicanus</i> KY636245 MX	19,0	20,0	19,7	19,8	0,4															
7	<i>Drepanocephalus</i> sp. KP053261 BR	19,0	20,0	19,7	19,8	0,4	0,0														
8	<i>Drepanocephalus spathans</i> KY636260 BR	19,0	20,0	19,7	19,8	0,0	0,4	0,4													
9	<i>Echinochasmus milvi</i> mt447046 RUS	11,3	13,4	11,5	11,6	18,7	18,9	18,9	18,7												
10	<i>Echinochasmus</i> sp. KT989667 HU	12,2	14,9	12,6	12,7	20,2	20,4	20,4	20,2	5,7											
11	<i>Echinochasmus</i> sp. KT989665 HU	12,2	14,9	12,6	12,7	20,2	20,4	20,4	20,2	5,7	0,0										
12	<i>Echinochasmus suiifunensis</i> MT447049 RUS	11,3	13,4	11,5	11,6	18,7	18,9	18,9	18,7	0,0	5,7	5,7									
13	<i>Isthmiophora hortensis</i> AB189982 JP	17,1	17,9	17,7	17,8	10,0	10,2	10,2	10,0	17,4	19,2	19,2	17,4								
14	<i>Paryphostomum radiatum</i> AY245708 ISR	18,2	18,8	19,3	19,3	9,3	9,6	9,6	9,3	17,9	19,8	19,8	17,9	6,5							
15	<i>Petasiger exaeretus</i> KY283998 HU	18,4	19,3	19,1	19,1	8,9	9,1	9,1	8,9	15,1	17,7	17,7	15,1	9,1	7,1						
16	<i>Petasiger phalacrocoracis</i> AY245709 ISR	17,5	18,2	18,2	18,2	8,0	8,2	8,2	8,0	17,9	19,4	19,4	17,9	4,9	2,9	6,6					
17	<i>Petasiger</i> sp. KM972995 HU	18,6	19,3	19,3	19,4	9,1	9,3	9,3	9,1	17,5	19,8	19,8	17,5	7,6	5,7	8,2	3,7				
18	<i>Rhopalias macracanthus</i> MK982815 MX	17,8	18,9	18,7	18,8	7,8	7,6	7,6	7,8	17,1	18,3	18,3	17,1	9,9	9,0	9,0	8,5	8,9			
19	<i>Rhopalias coronatus</i> MK982814 MX	20,5	22,3	21,6	21,7	9,5	9,3	9,3	9,5	19,5	21,2	21,2	19,5	11,7	11,9	11,9	11,4	12,2	4,1		

TABELA 3- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais da região transcrita interna 2 (ITS2) de Echinochasmidae gen. sp. obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Echinostomatoidea disponíveis no GenBank

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	<b>Echinochasmidae gen. sp.</b>																								
2	<i>Cathaemasia hians</i> AY761146 EUA	26,0																							
3	<i>Drepanocephalus spathans</i> KY677977 EUA	19,4	9,3																						
4	<i>Drepanocephalus</i> sp. KP053261 BR	19,8	10,1	0,8																					
5	<i>Echinochasmus coaxatus</i> KJ542641 UC	8,1	23,1	18,4	18,6																				
6	<i>Echinochasmus japonicus</i> MT268119 VNM	8,7	23,4	18,0	18,2	2,8																			
7	<i>Echinochasmus japonicus</i> MW828605 CN	8,7	23,4	18,0	18,2	2,8	0,0																		
8	<i>Echinochasmus milvi</i> MT447047 RUS	14,0	22,4	17,4	17,4	14,5	14,5	14,5																	
9	<i>Echinochasmus</i> sp. KT989665 HU	14,9	24,4	18,9	18,9	15,3	14,7	14,7	6,8																
10	<i>Echinochasmus</i> sp. KT989667 HU	15,3	24,9	18,9	18,9	15,7	15,1	15,1	6,8	0,4															
11	<i>Echinochasmus suifunensis</i> MT447049 RUS	14,2	22,7	17,6	17,6	14,5	14,3	14,3	0,2	6,7	6,7														
12	<i>Isthmiophora hortensis</i> AB189982 JP	19,8	6,3	7,5	8,1	18,2	17,8	17,8	17,8	19,7	19,7	18,0													
13	<i>Paryphostomum radiatum</i> AY245708 ISR	21,1	7,8	7,5	8,1	19,0	18,6	18,6	18,4	20,4	20,4	18,6	4,7												
14	<i>Petasiger phalacrocoracis</i> AY245709 ISR	20,6	7,3	7,9	8,1	18,2	18,2	18,2	17,6	19,0	19,0	17,8	4,3	4,9											
15	<i>Rhopalias coronatus</i> MK982814 MX	20,2	7,4	7,1	7,7	18,6	18,6	18,6	16,8	17,6	18,1	17,0	5,5	5,5	7,3										
16	<i>Rhopalias macracanthus</i> MK982815 MX	23,6	12,9	11,2	11,8	22,3	22,3	22,3	19,9	22,1	22,1	20,1	10,1	10,1	11,7	9,6									
17	<i>Ribeiroia marini</i> AY761147 PR	24,2	10,9	9,8	10,6	24,1	22,6	22,6	22,9	24,4	24,9	23,1	8,0	10,3	9,8	9,1	15,6								
18	<i>Ribeiroia ondatrae</i> HQ339962 EUA	14,1	9,0	6,6	6,8	14,9	14,7	14,7	13,5	15,7	16,0	13,5	6,0	6,3	7,3	5,7	6,0	0,3							
19	<i>Ribeiroia</i> sp. KF525784 AR	24,2	10,7	10,1	10,8	24,1	22,6	22,6	22,6	24,1	24,6	22,9	7,8	10,0	9,5	8,9	15,3	0,5	0,7						
20	<i>Sphaeridiotrema pseudoglobulus</i> GQ890330 CA	20,8	19,8	16,4	16,6	17,3	16,6	16,6	16,6	16,8	17,0	16,4	15,1	15,7	15,7	16,9	19,8	21,8	13,1	21,8					
21	<i>Stephanoprora amurensis</i> MT447045 RUS	14,5	22,3	16,7	16,7	14,7	14,1	14,1	6,0	8,2	8,2	5,8	18,4	19,3	18,1	18,0	21,0	23,8	13,9	23,3	15,4				
22	<i>Stephanoprora chasanensis</i> KT873321 RUS	14,9	22,8	16,9	16,9	15,0	14,1	14,1	6,0	8,4	8,4	5,8	18,2	19,1	17,9	18,3	21,4	23,7	13,9	23,2	15,1	0,4			

TABELA 4- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre o gene nuclear 28S de *Drepanocephalus spathans.*, *Neopetasiger* sp., e Echinostomatidae gen. sp. 1 obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Echinostomatoidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1 <i>Neopetasiger</i> sp. CNT																					
2 <i>Neopetasiger</i> sp. BT	0,1																				
3 Echinostomatidae gen. sp. 1 BH	3,2	3,1																			
4 Echinostomatidae gen. sp. 1 BT	3,3	3,2	0,0																		
5 Echinostomatidae gen. sp. 1 CNT	3,3	3,2	0,0	0,0																	
6 <i>Drepanocephalus spathans</i> BH	4,2	4,1	2,2	2,3	2,3																
7 <i>Drepanocephalus spathans</i> CNT	4,5	4,4	2,3	2,3	2,3	0,0															
8 <i>Drepanocephalus mexicanus</i> MF351544 MX	4,1	4,0	2,1	2,2	2,2	0,1	0,1														
9 <i>Drepanocephalus spathans</i> MF351545 MX	4,3	4,2	2,3	2,4	2,4	0,1	0,1	0,2													
10 <i>Drepanocephalus spathans</i> JN993269 EUA	4,2	4,1	2,2	2,3	2,3	0,0	0,0	0,1	0,1												
11 <i>Chaunocephalus ferox</i> KT447522 UC	3,2	3,2	2,0	2,1	2,1	3,0	3,2	2,9	3,1	3,0											
12 <i>Drepanocephalus spathans</i> KP053260 BR	4,2	4,1	2,2	2,3	2,3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	3,0										
13 <i>Drepanocephalus spathans</i> KP683117 EUA	4,2	4,1	2,2	2,3	2,3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	3,0	0,0									
14 <i>Drepanocephalus spathans</i> KY677977 EUA	4,4	4,3	2,2	2,3	2,3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	3,0	0,0	0,0								
15 <i>Drepanocephalus</i> sp. KP053261 BR	4,1	4,0	2,1	2,2	2,2	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	2,9	0,1	0,1	0,1							
16 <i>Neopetasiger islandicus</i> KT831344 CA	2,0	1,9	2,1	2,2	2,2	3,0	3,2	2,9	3,1	3,0	2,0	3,0	3,0	2,9	2,9						
17 <i>Neopetasiger islandicus</i> KT956924 EUA	2,0	1,9	2,1	2,2	2,2	3,0	3,2	2,9	3,1	3,0	2,0	3,0	3,0	2,9	2,9	0,0					
18 <i>Neopetasiger</i> sp. KT956925 EUA	0,1	0,0	3,1	3,2	3,2	4,1	4,4	4,0	4,2	4,1	3,2	4,1	4,1	4,3	4,0	1,9	1,9				
19 <i>Petasiger</i> sp. KM191807 CA	0,1	0,0	3,1	3,2	3,2	4,1	4,4	4,0	4,2	4,1	3,2	4,1	4,1	4,3	4,0	1,9	1,9	0,0			
20 <i>Petasiger exaeretus</i> KT956923 UC	4,6	4,6	3,1	3,2	3,2	3,5	3,7	3,4	3,6	3,5	2,9	3,5	3,5	3,4	3,4	3,2	3,2	4,6	4,6		
21 <i>Petasiger phalacrocoracis</i> KT956926 UC	4,8	4,7	3,0	3,1	3,1	3,6	3,8	3,5	3,7	3,6	3,0	3,6	3,6	3,7	3,5	3,4	3,4	4,7	4,7	1,5	
22 <i>Petasiger radiatus</i> KT956927 UC	4,7	4,6	3,0	3,1	3,1	3,4	3,7	3,3	3,5	3,4	3,2	3,4	3,4	3,5	3,3	3,4	3,4	4,6	4,6	1,5	1,0

TABELA 5- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre o gene mitocondrial *Nad-1* de *Drepanocephalus spathans*, *Neopetasiger* sp., e Echinostomatidae gen. sp. 1 obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Echinostomatoidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	<b><i>Drepanocephalus spathans</i> BH</b>																										
2	<b><i>Drepanocephalus spathans</i> BH</b>	0,0																									
3	<b><i>Drepanocephalus spathans</i> CNT</b>	1,3	1,3																								
4	<b><i>Neopetasiger</i> sp. BH</b>	27,1	27,1	29,0																							
5	<b><i>Neopetasiger</i> sp. BT</b>	27,1	27,1	29,0	0,0																						
6	<b><i>Neopetasiger</i> sp. CNT</b>	27,1	27,1	28,5	0,3	0,3																					
7	<b>Echinostomatidae gen. sp. 1 BH</b>	23,3	23,3	25,2	27,7	27,7	27,2																				
8	<b>Echinostomatidae gen. sp. 1 SL</b>	23,1	23,1	25,1	26,8	26,8	26,2	1,2																			
9	<i>Drepanocephalus spathans</i> KP053263 BR	0,5	0,5	0,8	27,9	27,9	27,4	24,2	24,1																		
10	<i>Drepanocephalus spathans</i> KY677939 EUA	1,0	1,0	0,8	27,7	27,7	27,2	23,7	23,6	0,5																	
11	<i>Drepanocephalus spathans</i> KY677951 EUA	4,9	4,9	4,8	28,9	28,9	28,2	23,5	23,3	4,7	4,2																
12	<i>Drepanocephalus mexicanus</i> KY636283 MX	12,5	12,5	12,5	28,6	28,6	27,9	25,2	24,8	12,6	12,1	11,9															
13	<i>Drepanocephalus mexicanus</i> KY636298 MX	15,9	15,9	15,5	28,4	28,4	27,7	25,9	25,6	15,8	15,3	14,6	4,2														
14	<i>Drepanocephalus spathans</i> KY636294 MX	0,8	0,8	0,5	27,9	27,9	27,4	24,0	23,8	0,2	0,2	4,4	12,3	15,6													
15	<i>Neopetasiger islandicus</i> KT831342 CA	28,2	28,2	29,8	20,0	20,0	19,5	27,8	27,4	29,0	28,8	28,8	31,3	31,5	29,0												
16	<i>Neopetasiger neocomense</i> JQ425591 RT	28,8	28,8	30,2	28,1	28,1	27,6	29,1	29,3	29,9	29,6	29,1	30,2	30,4	29,9	30,4											
17	<i>Neopetasiger</i> sp. 4. MH369313 CA	27,0	27,0	28,4	4,0	4,0	4,1	26,6	25,7	27,3	27,5	28,5	28,3	27,8	27,3	21,6	28,0										
18	<i>Neopetasiger</i> sp. 5 MZ404687 IE	32,0	32,0	33,2	25,3	25,3	24,7	30,9	30,6	33,0	32,7	31,7	34,0	33,5	33,0	18,9	31,2	26,0									
19	<i>Petasiger</i> sp. KT831343 CA	29,7	29,7	30,6	4,1	4,1	4,2	28,6	27,6	30,0	30,3	31,5	31,2	30,9	30,0	22,4	29,7	0,3	27,4								
20	<i>Petasiger</i> sp. 1 KM191809 AL	33,1	33,1	34,5	27,1	27,1	26,3	31,2	30,8	34,3	34,0	34,3	35,3	36,3	34,3	18,8	32,7	29,3	19,8	30,0							

21	<i>Petasiger</i> sp. 1 MK534361 AL	27,1	27,1	28,5	33,6	33,6	33,0	29,4	29,3	28,4	27,9	27,7	29,9	29,6	28,1	31,0	30,7	34,5	32,7	37,3	33,0							
22	<i>Petasiger</i> sp. 2 KM191810 AL	28,0	28,0	29,6	22,9	22,9	23,1	27,6	27,2	29,1	28,9	28,4	32,5	33,2	29,1	14,7	32,5	25,1	18,3	25,9	17,0	31,2						
23	<i>Petasiger</i> sp. 2 MK534386 QUE	25,6	25,6	27,0	28,1	28,1	27,4	25,9	25,6	26,4	26,2	27,7	28,4	29,4	26,4	26,8	28,4	28,0	30,4	30,6	32,0	24,7	28,4					
24	<i>Petasiger</i> sp. 3 MK534364 QUE	26,6	26,6	27,2	31,4	31,4	30,7	24,7	24,6	27,2	26,7	25,4	28,6	27,9	26,9	28,3	28,6	30,0	32,7	32,7	33,2	22,5	31,2	20,5				
25	<i>Petasiger</i> sp. 3 KM191816 AL	26,4	26,4	27,8	21,4	21,4	20,7	28,9	29,0	27,6	27,8	27,8	30,4	29,4	27,6	17,3	30,7	22,0	22,4	22,7	22,9	30,9	20,4	29,6	29,4			
26	<i>Petasiger</i> sp. 4 KM191817 CA	27,7	27,7	28,6	4,6	4,6	4,8	26,5	25,6	28,1	28,4	29,1	29,6	29,6	28,1	22,2	28,4	0,5	26,3	0,3	29,4	35,8	25,3	28,9	30,9	21,9		
27	<i>Petasiger</i> sp. 4 MK534379 QUE	27,1	27,1	29,3	26,9	26,9	26,1	26,7	26,3	28,4	27,9	27,4	29,9	29,6	28,1	26,0	30,9	27,5	32,0	29,4	31,4	26,7	25,5	26,4	23,2	27,6	28,9	
28	<i>Petasiger</i> sp. 4 MH369617 CA	29,7	29,7	30,6	4,1	4,1	4,2	28,6	27,6	30,0	30,3	31,5	31,2	30,9	30,0	22,4	29,7	0,3	27,4	0,0	30,0	37,3	25,9	30,6	32,7	22,7	0,3	29,4

TABELA 6- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais da região transcrita interna 2 (ITS2) de Echinostomatidae gen. sp. 1 obtida no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Echinostomatoidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <b>Echinostomatidae gen. sp. 1</b>															
2 <i>Drepanocephalus spathans</i> KY677976 EUA	3,0														
3 <i>Drepanocephalus spathans</i> KY636271 MX	2,8	0,0													
4 <i>Isthmiophora melis</i> AY168932 RU	4,7	5,0	4,7												
5 <i>Paryphostomum radiatum</i> KM973000 HU	5,0	4,7	4,5	0,2											
6 <i>Petasiger exaeretus</i> KY283998 HU	6,5	6,9	6,7	5,8	5,6										
7 <i>Petasiger radiatus</i> MG183690 IN	5,2	5,0	4,7	0,4	0,2	5,4									
8 <i>Petasiger phalacrocoracis</i> MZ412885 TZA	13,0	14,4	14,2	15,0	15,3	15,3	15,0								
9 <i>Petasiger</i> sp. KM972995 HU	5,0	4,8	4,5	2,8	2,6	5,4	2,8	15,1							
10 <i>Petasiger variospinosus</i> KX034047 AS	4,8	5,0	4,8	3,2	3,0	5,6	2,8	15,3	1,3						
11 <i>Pegosomum saginatum</i> KY945918 AL	5,2	5,6	5,4	4,3	4,1	2,8	3,9	14,4	4,1	4,3					
12 <i>Rhopalias coronatus</i> MK982814 MX	4,5	4,3	4,1	3,7	3,4	5,6	3,7	13,0	4,1	4,7	4,1				
13 <i>Rhopalias macracanthus</i> MK982815 MX	4,9	5,4	5,2	4,3	4,1	6,2	4,3	13,9	4,3	4,5	4,7	3,2			
14 <i>Rhopalias oochi</i> MK982803 MX	4,5	4,3	4,1	3,7	3,4	5,6	3,7	13,0	4,1	4,7	4,1	0,0	3,2		
15 <i>Rhopalias oochi</i> MK982804 MX	4,5	4,3	4,1	3,7	3,4	5,6	3,7	13,0	4,1	4,7	4,1	0,0	3,2	0,0	
16 <i>Fasciola hepatica</i> MN970007 AUS	8,6	9,4	9,4	6,8	7,1	9,6	7,3	12,9	8,1	8,4	8,3	8,3	8,8	8,3	8,3

TABELA 7- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre o gene nuclear 28S de *Echinostoma parcespinosum*, Echinostomatidae sp. 1 e Echinostomatidae sp. 2 obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Echinostomatoidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1	<b>Echinostomatidae gen. sp. 2</b>																		
2	<b>Echinostomatidae gen. sp. 3</b>	4,3																	
3	<b>Echinostomatidae gen. sp. 4</b>	2,2	4,6																
4	<i>Echinoparyphium aconiatum</i> KT956912 RT	3,2	4,3	3,3															
5	<i>Echinoparyphium ellisi</i> KY436410 NZ	3,3	4,3	3,4	1,1														
6	<i>Echinoparyphium poulini</i> KY436409 NZ	3,3	4,6	3,3	1,4	0,3													
7	<i>Echinoparyphium recurvatum</i> KT956913 ESK	3,4	4,4	3,5	1,2	0,2	0,3												
8	<i>Echinoparyphium rubrum</i> JF820595 EUA	3,3	4,5	3,4	1,2	0,2	0,2	0,1											
9	<i>Echinoparyphium</i> sp. KT956914 EUA	3,3	4,5	3,4	1,1	0,0	0,3	0,2	0,3										
10	<i>Echinostoma bolschewense</i> KP065591 ESK	2,5	4,2	2,8	2,8	2,8	3,0	2,9	3,0	2,9									
11	<i>Echinostoma caproni</i> MK482490 QUE	2,4	4,2	2,8	2,6	2,6	2,8	2,8	2,9	2,8	0,7								
12	<i>Echinostoma caproni</i> MK482501 QUE	2,4	4,3	2,9	2,7	2,7	2,9	2,9	3,0	2,8	0,7	0,1							
13	<i>Echinostoma</i> cf. <i>revolutum</i> KT956915 EUA	3,1	4,7	3,6	3,5	3,5	3,7	3,7	3,8	3,5	1,6	1,1	1,2						
14	<i>Echinostoma miyagawai</i> KT956916 UC	2,4	4,3	2,9	2,8	2,8	3,0	3,0	3,1	2,9	0,8	0,5	0,6	0,9					
15	<i>Echinostoma paraensei</i> EU025867 BR	2,4	4,4	3,1	3,0	3,0	3,1	3,1	3,2	3,1	1,0	0,7	0,7	0,9	0,5				
16	<i>Echinostoma revolutum</i> KT971136 PL	3,9	5,8	4,3	4,5	4,5	4,6	4,6	4,7	4,6	2,6	2,1	2,2	1,4	1,8	2,1			
17	<i>Echinostoma</i> sp. KP065606 AL	2,5	4,4	3,0	3,1	3,1	3,3	3,3	3,4	3,3	1,3	1,2	1,2	1,4	1,0	1,1	2,2		
18	<i>Echinostoma</i> sp.n. KP065602 RT	2,3	4,2	2,7	2,8	2,8	3,0	3,0	3,1	2,9	1,0	0,5	0,6	0,9	0,3	0,3	1,9	1,1	
19	<i>Echinostoma</i> sp.n. KP065603 AL	2,3	4,2	2,7	2,8	2,8	3,0	3,0	3,1	2,9	1,0	0,5	0,6	0,9	0,3	0,3	1,9	1,1	0,0

TABELA 8- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre o gene mitocondrial *Nad-1* de Echinostomatidae sp. 1 e Echinostomatidae sp. 2 obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Echinostomatoidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1	<b>Echinostomatidae gen. sp. 2</b>																						
2	<b>Echinostomatidae gen. sp. 3</b>	19,5																					
3	<b>Echinostomatidae gen. sp. 4</b>	24,0	21,7																				
4	<i>Echinoparyphium</i> sp. GQ463123 EUA	19,5	23,5	25,2																			
5	<i>Echinoparyphium aconiatum</i> AY168945 FI	20,1	20,7	21,7	18,4																		
6	<i>Echinoparyphium ellisi</i> KY436405 NZ	24,2	21,8	25,5	18,7	20,1																	
7	<i>Echinoparyphium poulini</i> KY436401 NZ	23,0	23,5	23,6	17,3	20,7	15,6																
8	<i>Echinoparyphium recurvatum</i> AY168938 BGR	23,3	22,9	25,5	20,4	23,2	19,0	18,4															
9	<i>Echinoparyphium</i> sp. GQ463106 EUA	22,2	21,0	23,3	17,6	17,3	13,9	14,4	15,6														
10	<i>Echinoparyphium</i> sp. GQ463122 EUA	20,4	22,4	24,8	2,3	19,3	18,1	17,3	19,8	17,0													
11	<i>Echinoparyphium</i> sp. JQ670863 EUA	21,6	21,0	23,0	17,3	19,5	13,3	15,9	18,1	14,2	16,7												
12	<i>Echinostoma miyagawai</i> KY436400 NZ	17,5	18,1	22,4	22,9	19,5	24,4	25,5	24,6	21,8	23,2	21,8											
13	<i>Echinostoma</i> sp.n. KP065676 RT	18,1	18,4	22,0	22,9	21,8	21,0	22,7	23,8	21,2	23,2	20,7	15,3										
14	<i>Echinostoma bolschewense</i> KP065608 ESK	17,8	17,6	20,8	22,4	19,3	20,7	22,9	23,2	19,5	21,8	20,4	14,4	14,4									
15	<i>Echinostoma caproni</i> AF025837 MDG	16,9	19,3	19,3	22,4	18,1	23,2	24,1	23,2	21,8	22,4	21,8	11,9	15,9	15,9								
16	<i>Echinostoma cf. friedri</i> AY168937 UC	16,6	18,7	19,9	21,5	19,0	23,2	22,1	23,8	19,8	21,0	21,8	17,0	18,1	15,9	16,1							
17	<i>Echinostoma malayanum</i> JF412731 THA	20,7	21,1	21,6	22,2	24,2	24,2	23,6	24,2	22,8	21,1	23,4	19,4	21,4	20,5	18,8	19,1						
18	<i>Echinostoma miyagawai</i> KY436400 NZ	17,5	18,1	22,4	22,9	19,5	24,4	25,5	24,6	21,8	23,2	21,8	0,0	15,3	14,4	11,9	17,0	19,4					
19	<i>Echinostoma novaesealandense</i> KY436397 NZ	17,8	18,1	19,6	22,9	18,7	23,8	24,9	23,8	22,7	23,2	22,7	8,2	12,7	12,7	11,3	18,1	19,7	8,2				
20	<i>Echinostoma paraensei</i> AF025834 BR	18,4	19,3	20,8	22,4	19,5	22,9	24,4	25,2	23,8	21,2	21,5	14,7	12,5	15,3	13,6	16,4	22,5	14,7	13,9			
21	<i>Echinostoma paraulum</i> KP065677 AL	18,4	18,1	19,9	22,1	20,1	22,7	22,9	21,0	22,9	21,8	20,7	9,6	14,7	13,9	13,0	16,7	18,8	9,6	10,2	14,4		
22	<i>Echinostoma revolutum</i> GQ463057 EUA	15,7	20,1	21,7	23,5	22,7	22,4	24,1	24,6	21,0	23,5	23,8	10,8	13,0	12,5	14,4	17,3	19,9	10,8	10,2	15,6	13,0	
23	<i>Echinostoma robustum</i> GQ463053 EUA	17,8	18,4	22,0	22,1	21,0	25,2	24,9	25,5	22,4	22,9	23,2	3,7	14,7	14,7	12,7	16,7	19,1	3,7	8,2	14,7	9,1	11,0

TABELA 9- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre o gene nuclear 28S de *Rhopalias* spp. e *Ribeiroia* sp. obtidas no presente estudo (em negrito) e seqüências de outros Echinostomatoidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1	<b><i>Rhopalias</i> sp. 1 BH</b>																						
2	<b><i>Rhopalias</i> sp. 2 JAN</b>	0,0																					
3	<b><i>Rhopalias</i> sp. 2 JAN</b>	0,0	0,0																				
4	<b><i>Rhopalias</i> sp. 2 PM</b>	0,0	0,0	0,0																			
5	<b><i>Rhopalias</i> sp. 3 DI</b>	1,0	1,0	1,0	1,0																		
6	<b><i>Ribeiroia</i> sp. BH</b>	4,8	4,8	4,8	4,8	5,0																	
7	<i>Cathaemasia hians</i> KT956947 RT	3,0	3,0	3,0	3,0	3,1	3,9																
8	<i>Drepanocephalus</i> sp. KP053261 BR	4,7	4,7	4,7	4,7	5,2	6,6	4,7															
9	<i>Drepanocephalus spathans</i> JN993269 EUA	4,8	4,8	4,8	4,8	5,3	6,7	4,8	3,1														
10	<i>Echinostoma bolschewense</i> KP065591 ESK	5,6	5,6	5,6	5,6	6,3	7,5	6,0	5,2	6,1													
11	<i>Echinostoma paraensei</i> EU025867 BR	5,8	5,8	5,8	5,8	6,3	7,8	6,1	5,4	6,4	6,3												
12	<i>Isthmiophora melis</i> KT359583 PL	3,5	3,5	3,5	3,5	4,1	6,0	4,1	2,7	3,2	3,1	3,1											
13	<i>Isthmiophora</i> sp. KT956920 EUA	3,3	3,3	3,3	3,3	3,8	5,8	3,8	2,6	3,0	2,9	2,9	3,0										
14	<i>Neopetasiger</i> sp. KT956925 EUA	4,8	4,8	4,8	4,8	5,1	6,2	5,4	3,4	4,5	4,4	4,4	4,5	6,4									
15	<i>Petasiger exaeretus</i> KT956923 UC	3,9	3,9	3,9	3,9	4,5	6,6	4,1	2,9	3,4	3,4	3,4	3,4	5,8	5,6								
16	<i>Petasiger radiatus</i> KT956927 UC	4,0	4,0	4,0	4,0	4,6	6,5	3,8	3,0	3,4	3,3	3,3	3,4	5,6	5,4	6,1							
17	<i>Rhopalias coronatus</i> MK648281 MX	0,2	0,2	0,2	0,2	1,3	5,5	3,2	4,7	5,8	5,7	5,7	5,8	6,0	5,8	6,6	6,3						
18	<i>Rhopalias macracanthus</i> KT956959 EUA	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	4,7	2,7	3,9	4,6	4,5	4,5	4,6	5,7	5,1	5,8	5,5	5,7					
19	<i>Rhopalias macracanthus</i> MK648280 MX	0,7	0,7	0,7	0,7	1,2	4,8	2,8	3,9	5,0	4,9	4,9	5,0	5,5	5,2	5,9	5,6	5,7	3,5				
20	<i>Ribeiroia ondatrae</i> KT956956 EUA	4,3	4,3	4,3	4,3	4,7	0,6	3,5	5,0	6,1	6,0	6,0	6,1	6,8	6,8	7,1	6,9	6,9	5,5	5,2			
21	<i>Ribeiroia</i> sp. 2 MK482439 QUE	4,2	4,2	4,2	4,2	4,6	0,2	3,4	5,0	5,9	5,8	5,8	5,9	6,6	6,6	7,1	6,9	6,9	5,3	5,1	5,6		
22	<i>Ribeiroia</i> sp. 3 MK482461 QUE	4,5	4,5	4,5	4,5	4,9	0,9	3,7	5,3	6,2	6,1	6,1	6,2	6,7	6,7	7,2	7,0	7,0	5,6	5,4	5,9	5,9	
23	<i>Fasciola gigantica</i> EU025873 QUE	8,1	8,1	8,1	8,1	8,6	10,5	7,8	7,6	7,9	7,9	7,9	7,9	7,4	7,1	7,6	7,6	7,8	7,9	7,8	8,1	8,3	7,3

TABELA 10- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) de *Rhopalias* spp. e *Ribeiroia* sp. obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Echinostomatoidea

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	<b><i>Rhopalias</i> sp. 1 BH</b>																					
2	<b><i>Rhopalias</i> sp. 1 BH</b>	0,0																				
3	<b><i>Rhopalias</i> sp. 2 PM</b>	0,2	0,2																			
4	<b><i>Rhopalias</i> sp. 2 JAN</b>	0,0	0,0	0,0																		
5	<b><i>Rhopalias</i> sp. DI</b>	1,7	1,7	1,5	1,4																	
6	<b><i>Ribeiroia</i> sp. BH</b>	7,5	7,3	7,4	7,2	7,3																
7	<b><i>Ribeiroia</i> sp. F</b>	7,6	7,4	7,5	7,3	7,4	0,0															
8	<b><i>Ribeiroia</i> sp. RJ</b>	7,6	7,4	7,5	7,3	7,4	0,0	0,0														
10	<i>Drepanocephalus auritus</i> KY677977 EUA	8,1	7,4	7,4	7,2	7,1	9,9	9,8	9,4													
12	<i>Drepanocephalus spathans</i> KY636271 MX	8,1	7,4	7,4	7,2	7,1	9,9	9,8	9,4	0,0												
14	<i>Isthmiophora meliis</i> KT359584 PL	7,8	7,7	7,6	7,5	7,0	8,8	8,7	8,5	9,3	9,3											
16	<i>Isthmiophora melis</i> AY168932 JP	7,5	7,4	7,5	7,4	6,9	9,8	9,8	9,8	8,9	8,9	8,9										
18	<i>Pegosomum saginatum</i> KY945918 AL	8,8	8,4	8,4	8,2	7,9	9,8	9,8	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5									
20	<i>Petasiger exaeretis</i> KY283998 HU	9,1	8,7	8,6	8,5	8,2	10,5	10,5	10,2	9,5	9,5	9,5	9,5	7,8								
22	<i>Petasiger</i> sp. KM972995 HU	7,9	7,9	7,8	7,8	7,2	9,6	9,5	9,4	8,6	8,6	8,6	8,6	5,9	4,9							
24	<i>Rhopalias coronatus</i> MK982813 MX	0,7	0,7	0,8	0,6	1,4	7,4	7,5	7,5	8,0	8,0	8,0	8,0	7,7	7,5	7,5						
26	<i>Rhopalias coronatus</i> MK982814 MX	0,7	0,7	0,8	0,6	1,4	7,4	7,5	7,5	8,0	8,0	8,0	8,0	7,7	7,5	7,5	8,7					
28	<i>Rhopalias macracanthus</i> MK982815 MX	6,5	6,5	6,3	5,8	5,5	11,4	11,5	11,5	11,0	11,0	11,0	11,0	10,5	10,7	11,0	12,2	12,4				
30	<i>Rhopalias oochi</i> MK982800 MX	0,7	0,7	0,8	0,6	1,4	7,4	7,5	7,5	8,0	8,0	8,0	8,0	7,7	7,5	7,5	8,7	9,0	7,6			
32	<i>Rhopalias oochi</i> MK982802 MX	0,7	0,7	0,8	0,6	1,4	7,4	7,5	7,5	8,0	8,0	8,0	8,0	7,7	7,5	7,5	8,7	9,0	7,6	0,0		
34	<i>Rhopalias oochi</i> MK982803 MX	0,7	0,7	0,8	0,6	1,4	7,4	7,5	7,5	8,0	8,0	8,0	8,0	7,7	7,5	7,5	8,7	9,0	7,6	0,0	0,0	
36	<i>Rhopalias oochi</i> MK982804 MX	0,7	0,7	0,8	0,6	1,4	7,4	7,5	7,5	8,0	8,0	8,0	8,0	7,7	7,5	7,5	8,7	9,0	7,6	0,0	0,0	0,0
38	<i>Fasciola hepatica</i> MN970007 AUS	12,9	12,3	12,4	12,0	12,0	13,8	14,1	13,7	13,4	13,4	13,4	13,4	13,9	12,9	13,7	14,5	15,1	13,4	12,9	12,9	12,9

TABELA 11- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais da região transcrita interna (ITS2) de *Rhopalias* spp. e *Ribeiroia* sp. obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Echinostomatoidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1	<b><i>Rhopalias</i> sp. 1 BH</b>																			
2	<b><i>Rhopalias</i> sp. 1 BH</b>	0,0																		
3	<b><i>Rhopalias</i> sp. 2 PM</b>	0,0	0,0																	
4	<b><i>Rhopalias</i> sp. 2 JAN</b>	0,0	0,0	0,0																
5	<b><i>Rhopalias</i> sp. DI</b>	2,4	2,4	2,4	2,4															
6	<b><i>Ribeiroia</i> sp. BH</b>	7,7	7,7	7,7	7,7	6,9														
7	<b><i>Ribeiroia</i> sp. F</b>	7,7	7,7	7,7	7,7	6,9	0,0													
8	<b><i>Ribeiroia</i> sp. RJ</b>	7,7	7,7	7,7	7,7	6,9	0,0	0,0												
9	<i>Cathaemasia hians</i> AY761146 EUA	6,9	6,9	6,9	6,9	5,3	9,1	9,1	9,1											
10	<i>Echinostoma caproni</i> AJ564382 EG	14,7	14,7	14,7	14,7	14,1	16,8	16,8	16,8	16,8										
11	<i>Echinostoma caproni</i> ECU58098 MDG	14,4	14,4	14,4	14,4	13,9	16,3	16,3	16,3	16,6	0,3									
12	<i>Echinostoma malayanum</i> JF412730 THA	13,6	13,6	13,6	13,6	13,1	14,7	14,7	14,7	14,1	7,7	7,5								
13	<i>Echinostoma miyagawai</i> MH796365 CN	13,9	13,9	13,9	13,9	13,3	15,7	15,7	15,7	16,0	2,9	2,7	6,4							
14	<i>Rhopalias coronatus</i> MK982814 MX	0,8	0,8	0,8	0,8	1,8	7,2	7,2	7,2	6,4	14,1	13,9	13,1	13,3						
15	<i>Rhopalias macracanthus</i> MK982815 MX	7,4	7,4	7,4	7,4	5,5	9,8	9,8	9,8	8,0	17,3	17,1	16,5	16,0	7,4					
16	<i>Rhopalias oochi</i> MK982804 MX	0,8	0,8	0,8	0,8	1,8	7,2	7,2	7,2	6,4	14,1	13,9	13,1	13,3	0,0	7,4				
17	<i>Ribeiroia marini</i> AY761147 PR	8,0	8,0	8,0	8,0	7,2	0,5	0,5	0,5	9,3	16,5	16,0	14,4	15,5	7,4	10,1	7,4			
18	<i>Ribeiroia ondatrae</i> AY761142 EUA	8,8	8,8	8,8	8,8	8,0	1,1	1,1	1,1	9,9	16,8	16,3	14,7	15,7	8,2	10,9	8,2	1,1		
19	<i>Ribeiroia</i> sp. KF525784 AR	7,7	7,7	7,7	7,7	6,9	0,0	0,0	0,0	9,1	16,8	16,3	14,7	15,7	7,2	9,8	7,2	0,5	1,1	
20	<i>Fasciola gigantica</i> AM850108 NG	12,4	12,4	12,4	12,4	11,1	13,7	13,7	13,7	11,1	15,4	15,1	13,7	15,0	12,1	14,3	12,1	14,3	14,7	13,7

TABELA 12- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre o gene mitocondrial *Nad-1* de *Rhopalias* spp. obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Echinostomatoidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1 <b><i>Rhopalias</i> sp. 1 BH</b>																							
2 <b><i>Rhopalias</i> sp. 1 BH</b>	0,0																						
3 <b><i>Rhopalias</i> sp. 2 JAN</b>	8,9	8,3																					
4 <b><i>Rhopalias</i> sp. 2 JAN</b>	8,3	7,7	1,8																				
5 <b><i>Rophalias</i> SP. 2 PM</b>	8,4	8,4	2,4	2,1																			
6 <b><i>Rhopalias</i> SP. 3 DI</b>	9,9	9,9	9,8	9,9	9,9																		
7 <i>Artyfechinostomum malayanum</i> JF412731 THA	25,8	21,9	28,7	28,0	25,9	22,9																	
8 <i>Drepanocephalus spathans</i> KP053262 EUA	28,0	25,6	29,0	29,0	27,1	23,4	29,3																
9 <i>Drepanocephalus</i> sp. KP053264 BR	29,0	27,6	29,5	30,2	27,7	26,9	32,8	13,4															
10 <i>Echinoparyphium aconiatum</i> AY168945 FI	28,2	23,3	29,0	29,2	24,7	24,6	27,0	28,0	30,0														
11 <i>Echinoparyphium</i> sp. GQ463106 EUA	25,4	21,9	26,1	26,2	23,2	21,3	25,5	28,2	32,0	29,7													
12 <i>Echinostoma miyagawai</i> KY436400 NZ	26,4	22,7	27,4	26,2	23,8	23,1	22,0	24,2	27,0	24,2	24,2												
13 <i>Echinostoma revolutum</i> KP455633 THA	26,7	23,5	27,7	26,4	24,7	22,7	21,5	24,6	28,8	25,4	24,6	28,0											
14 <i>Echinostoma paraulum</i> KP065677 AL	25,2	21,9	27,7	26,4	24,7	20,8	20,2	26,7	28,2	27,2	26,7	28,0	23,4										
15 <i>Echinostoma revolutum</i> GQ463057 EUA	26,4	23,6	27,7	27,0	25,6	24,0	21,5	24,4	29,0	24,9	24,4	28,7	24,7	24,7									
16 <i>Echinostoma robustum</i> GQ463053 EUA	26,2	22,7	28,7	27,5	26,2	24,0	21,7	25,2	27,5	25,2	25,2	26,7	23,7	27,5	27,5								
17 <i>Echinostoma</i> sp. AF026285 AUS	24,4	21,0	25,1	25,2	22,6	19,3	25,3	30,0	31,0	29,2	30,0	30,2	21,4	20,9	23,2	24,4							
18 <i>Echinostoma trivolvis</i> AF025831 EUA	24,9	22,7	27,4	27,0	26,5	22,8	22,5	28,0	29,7	28,2	28,0	29,0	23,7	25,2	24,7	25,4	23,4						
19 <i>Isthmiophora hortensis</i> AB189981 JP	36,1	35,3	35,1	34,3	35,3	33,4	35,4	33,8	35,1	34,6	33,8	34,1	37,9	34,8	35,9	34,6	35,9	34,8					
20 <i>Isthmiophora melis</i> KU516829 LT	36,1	35,3	35,6	35,6	34,4	33,9	34,2	32,6	34,0	32,1	32,6	32,3	37,8	34,5	36,4	36,4	36,7	34,0	33,2				
21 <i>Neopetasiger islandicus</i> KT831342 CA	30,0	28,7	31,1	30,5	29,2	25,1	30,8	29,0	32,5	29,5	29,0	32,2	28,5	30,7	31,7	31,0	30,7	28,0	26,9	27,2			
22 <i>Petasiger islandicus</i> JQ425590 IS	30,0	28,7	31,1	30,7	29,2	26,3	29,8	28,5	31,7	29,0	28,5	31,2	28,7	31,0	32,2	30,7	30,2	27,5	26,9	27,2	28,5		
23 <i>Petasiger</i> sp.4 KM191817 CA	31,2	29,8	32,1	32,2	28,9	29,5	31,1	29,7	30,0	28,7	29,7	29,7	31,2	31,2	34,5	32,0	30,0	30,0	29,8	28,2	29,0	30,0	
24 <i>Fasciola hepatica</i> MF287675 BR	25,7	21,0	25,8	25,7	21,4	20,5	22,7	27,5	29,2	28,0	27,5	28,7	24,9	26,4	29,0	28,0	27,2	21,7	21,5	23,7	24,7	24,9	33,2

TABELA 13- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre o gene mitocondrial *Cox 1* de *Rhopalias* spp. obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Echinostomatoidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	<b><i>Rhopalias</i> sp. 1 BH</b>															
2	<b><i>Rhopalias</i> sp. 2 JAN</b>	7,3														
3	<b><i>Rhopalias</i> sp. 2 PM</b>	7,9	1,3													
4	<i>Drepanocephalus mexicanus</i> KY636229 MX	25,1	25,5	25,4												
6	<i>Echinoparyphium</i> sp. MH369310 CA	22,3	23,2	22,6	23,9											
8	<i>Echinostoma trivolvis</i> KM538091 CA	22,2	22,3	22,7	27,8	25,8										
9	<i>Hypoderaeum conoideum</i> KM538101 CA	24,0	25,1	24,2	26,8	27,1	18,2									
10	<i>Rhopalias coronatus</i> MK982772 MX	9,3	9,5	9,5	24,4	22,1	23,6	23,8								
11	<i>Rhopalias coronatus</i> MK982773 MX	9,3	9,5	9,5	24,4	22,1	23,6	23,8	21,8							
12	<i>Rhopalias coronatus</i> MK982774 MX	9,5	9,7	9,7	24,2	22,4	23,1	23,9	22,0	24,6						
13	<i>Rhopalias macracanthus</i> MK982783 MX	16,3	15,2	15,5	23,4	22,3	21,7	22,0	20,3	22,3	16,9					
14	<i>Rhopalias macracanthus</i> MK982784 MX	16,5	15,4	15,7	23,2	22,4	21,9	21,8	20,4	22,3	17,0	17,0				
15	<i>Rhopalias macracanthus</i> MK982785 MX	16,3	15,1	15,4	23,6	22,3	21,5	21,6	20,1	22,2	16,7	16,7	16,7			
16	<i>Rhopalias oochi</i> MK982780 MX	9,0	10,1	9,5	24,7	22,7	23,9	24,3	23,4	22,9	7,5	7,7	7,7	7,7		
17	<i>Rhopalias oochi</i> MK982781 MX	9,0	10,1	9,5	24,7	22,7	23,9	24,3	23,4	22,9	7,5	7,7	7,7	7,7	7,7	
18	<i>Rhopalias oochi</i> MK982782 MX	9,0	10,1	9,5	24,7	22,7	23,9	24,3	23,4	22,9	7,5	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7
19	<i>Fasciola hepatica</i> M93388.1	20,0	19,6	20,0	24,7	23,1	20,9	21,5	19,2	22,3	20,6	20,8	20,8	20,8	20,8	20,8

TABELA 14- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre o gene mitocondrial *Cox 1* de *Ribeiroia* sp. obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de *Ribeiroia ondatrae* disponíveis no GenBank.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	<b><i>Ribeiroia</i> sp.</b>								
2	<i>Ribeiroia ondatrae</i> MW042977 EUA	12,3							
3	<i>Ribeiroia ondatrae</i> MW042976 EUA	12,5	0,2						
4	<i>Ribeiroia ondatrae</i> MW042975 EUA	12,5	0,2	0,0					
5	<i>Ribeiroia ondatrae</i> MW042974 EUA	12,5	0,2	0,0	0,0				
6	<i>Ribeiroia ondatrae</i> MW042973 EUA	12,3	0,0	0,2	0,2	0,2			
7	<i>Ribeiroia ondatrae</i> MW042972 EUA	12,3	0,0	0,2	0,2	0,2	0,0		
8	<i>Ribeiroia ondatrae</i> MW042971 EUA	12,3	0,0	0,2	0,2	0,2	0,0	0,0	
9	<i>Ribeiroia ondatrae</i> MW042970 EUA	12,3	0,0	0,2	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0
10	<i>Fasciola hepatica</i> AP017707	15,0	14,7	15,0	15,0	15,0	14,7	14,7	14,7

TABELA 15- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre o gene nuclear 28S das xifidiocercárias obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Plagiorchioidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1	<b>Haematoloechus sp.</b>																												
2	<b>Magnivittellinum sp.</b>	12,5																											
3	<b>Haematoloechidae gen. sp.</b>	9,4	13,3																										
4	<b>Plagiorchioidea gen. sp.</b>	9,5	11,3	10,3																									
5	<b>Renifer sp.</b>	9,5	12,4	11,4	8,9																								
6	<i>Dasymetra nicolli</i> AF433672 EUA	8,9	11,4	10,3	8,4	1,7																							
7	<i>Glypthelmins brownorumae</i> AY875674 MX	12,0	14,9	11,6	11,3	12,1	13,5																						
8	<i>Glypthelmins tuxtlasensis</i> AY278047 MX	11,5	14,1	11,4	10,7	11,6	13,1	13,3																					
9	<i>Haematoloechus abbreviatus</i> AF184251 UC	2,2	12,0	8,5	8,8	9,2	11,5	11,5	11,8																				
10	<i>Haematoloechus asper</i> AF151934 UC	7,9	12,6	8,9	9,3	9,1	11,9	12,0	11,7	12,0																			
11	<i>Haematoloechus breviplexus</i> AF387800 EUA	4,4	13,2	9,2	9,3	10,2	12,4	12,4	12,4	12,7	12,6																		
12	<i>Haematoloechus complexus</i> AF387797 EUA	3,8	13,6	11,1	10,7	11,2	13,4	13,4	13,5	13,4	13,6	9,1																	
13	<i>Infidum infidum</i> MW317230 BR	8,9	11,0	10,2	7,3	6,6	10,9	11,0	11,1	11,1	6,9	7,0																	
14	<i>Infidum similis</i> KU726885 MX	9,4	11,1	10,7	7,7	6,7	11,2	11,3	11,4	11,4	11,4	7,2	7,0	7,6															
15	<i>Lechriorchis tygarti</i> JF820603 EUA	9,0	11,3	10,5	8,2	1,4	11,3	11,5	11,3	11,0	11,5	7,1	7,0	8,4	8,4														
16	<i>Magnivittellinum saltaensis</i> MN74431 AR	12,4	0,3	13,6	11,5	12,0	8,1	8,0	8,1	7,9	8,1	11,3	10,7	12,0	12,0	12,0													
17	<i>Magnivittellinum simplex</i> KU535678 MX	12,4	0,3	13,6	11,5	12,0	8,1	8,0	8,1	7,9	8,1	11,3	10,7	12,0	12,0	12,0	10,8												
18	<i>Magnivittellinum simplex</i> KU535683 MX	12,9	1,3	13,5	11,7	12,6	8,6	8,4	8,6	7,9	8,6	11,4	10,8	12,0	12,0	11,9	10,9	10,9											
19	<i>Metaleptophallus gracillimus</i> AF151912 UC	13,0	1,6	13,9	11,8	12,7	8,6	8,5	8,6	8,0	8,6	11,4	11,0	12,1	12,1	12,0	10,9	10,9	11,4										
20	<i>Neoglyphe locellus</i> AF300330 UC	11,8	8,5	11,8	10,2	11,8	8,1	8,3	8,6	8,1	8,3	9,3	8,9	11,3	11,3	11,2	9,2	8,7	9,4	11,0									
21	<i>Ochetosoma kansense</i> AF433671 EUA	9,0	10,9	8,9	7,5	9,1	10,1	10,1	10,4	10,2	10,3	6,6	6,2	8,5	8,5	8,7	5,7	6,0	6,3	8,4	11,2								
22	<i>Opisthioglyphe ranae</i> AF151929 UC	8,7	11,1	10,2	7,8	1,0	11,0	11,1	11,0	10,8	11,1	6,7	6,7	8,3	8,3	8,6	6,6	6,3	6,9	0,8	10,8	10,7							
23		8,5	10,7	9,3	7,2	6,5	10,1	10,3	10,4	10,0	10,3	6,1	6,1	6,9	6,9	6,3	5,4	5,4	5,9	5,4	11,0	10,8	11,1						

24	<i>Plagiorchis neomidis</i> KJ533397 ESK	10,3	11,7	10,7	8,9	9,4	11,8	11,8	11,9	11,7	11,8	8,2	8,1	9,2	9,2	9,2	7,7	7,6	8,2	8,7	12,9	12,5	13,2	12,7						
25	<i>Plagiorchis vespertilionis</i> AF151931 UC	10,2	11,6	10,3	8,2	9,2	11,6	11,7	11,9	11,5	11,7	7,4	7,6	8,9	8,9	9,1	6,8	6,8	7,3	8,4	12,3	11,7	12,7	12,0	11,7					
26	<i>Rauschiella tineri</i> AY875677 MX	9,4	11,4	9,5	7,8	9,3	10,8	11,0	11,2	11,0	11,0	6,2	7,2	9,1	9,1	9,1	6,7	6,4	6,7	8,3	11,5	11,6	11,7	11,5	11,1	0,1				
27	<i>Renifer aniarum</i> HQ665459 EUA	9,1	11,6	10,4	8,2	1,8	11,2	11,4	11,2	11,3	11,4	7,0	6,9	7,9	7,9	8,5	6,9	6,6	7,2	1,5	11,2	11,2	11,4	10,6	10,6	8,3	11,1			
28	<i>Renifer aniarum</i> HQ665460 IT	9,1	11,6	10,4	8,2	1,8	11,2	11,4	11,2	11,3	11,4	7,0	6,9	7,9	7,9	8,5	6,9	6,6	7,2	1,5	11,2	11,2	11,4	10,6	10,6	8,3	11,1	10,7		
29	<i>Renifer kansensis</i> LC557511 JP	8,7	11,1	10,2	7,8	1,0	11,0	11,1	11,0	10,8	11,1	6,7	6,7	8,3	8,3	8,6	6,6	6,3	6,9	0,8	10,8	10,7	11,1	10,5	10,3	8,0	10,7	10,4	8,0	
30	<i>Rubenstrema exasperatum</i> AY222275 BGR	9,0	10,9	8,9	7,5	9,2	9,9	9,9	10,3	10,0	10,1	6,6	6,2	8,6	8,6	8,7	5,7	6,0	6,3	8,5	11,1	10,4	11,5	10,5	10,7	6,7	10,7	10,6	8,6	8,7

TABELA 16- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) das xifidiocercárias obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Plagiorchioidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1	<b>Haematoloechus sp.</b>																						
2	<b>Haematoloechidae gen. sp.</b>	9,5																					
3	<b>Plagiorchioidea gen. sp.</b>	14,1	16,1																				
4	<b>Renifer sp.</b>	14,2	16,5	16,0																			
5	<i>Alloglossidium progeneticum</i> MH041382 EUA	15,8	15,6	16,8	14,9																		
6	<i>Aptorchis aequalis</i> EF014729 AUS	12,6	15,6	14,0	15,4	15,5																	
7	<i>Aptorchis aequalis</i> EU334369 AUS	12,6	15,6	14,0	15,4	15,5	0,0																
8	<i>Choanocotyle hobbsi</i> EU196356 AUS <i>Haematoloechus abbreviatus</i> AF316156 UC	12,8	15,4	12,7	14,0	15,4	4,2	4,2															
9	<i>Haematoloechus asper</i> AF316164 UC	2,8	10,0	13,4	14,4	15,4	12,0	12,0	12,4														
10	<i>Haematoloechus breviplexus</i> AF387796 EUA	9,6	13,9	15,2	14,2	16,2	14,2	14,2	14,1	9,2													
11	<i>Haematoloechus complexus</i> AF316155 EUA	4,1	11,1	13,7	13,8	16,0	12,8	12,8	12,6	4,9	9,1												
12	<i>Lechriorchis tygarti</i> JF820600 EUA	2,9	11,0	14,8	13,8	15,9	13,1	13,1	13,7	4,7	10,9	5,6											
13	<i>Lechriorchis tygarti</i> JF820601 EUA	14,3	16,0	15,7	2,0	15,3	15,5	15,5	14,2	14,6	14,3	13,8	14,0										
14	<i>Macroderoides sp.</i> HQ680850 EUA	14,3	16,0	15,8	2,0	15,3	15,5	15,5	14,3	14,6	14,4	13,8	14,0	14,0									
15	<i>Macroderoides spiniferus</i> EU850403 EUA	10,4	12,8	11,8	13,0	15,4	11,7	11,7	10,8	10,6	11,9	10,1	11,4	11,4	10,6								
16	<i>Macroderoides texanus</i> EU850398 EUA <i>Paramacroderoides echinus</i> MH041375 EUA	10,0	12,8	12,1	12,8	15,2	11,6	11,6	11,1	10,6	11,7	10,0	11,3	11,1	10,5	10,3							
17	<i>Paramacroderoides kinsellai</i> HM137664 EUA	10,0	12,8	11,9	12,9	15,4	11,8	11,8	11,0	10,6	11,8	10,2	11,3	11,0	10,7	10,4	10,6						
18	<i>Renifer aniarum</i> HQ665459 EUA	11,0	13,3	14,0	14,5	15,7	12,6	12,6	12,5	11,2	13,0	10,9	11,8	12,6	11,8	11,8	11,4	14,3					
19	<i>Skrjabinocercis similis</i> AF316168 UC	11,1	13,3	14,0	14,5	15,9	12,8	12,8	12,6	11,3	13,1	10,9	11,9	12,7	11,8	11,9	11,3	14,3	14,3				
20	<i>Telorchis bonnerensis</i> JF820593 EUA	13,5	15,6	15,4	1,7	15,0	14,4	14,4	13,4	13,7	13,5	12,9	13,1	13,1	13,4	13,0	13,1	1,4	1,4	12,6			
21	<i>Philophthalmus gralli</i> JQ627832 PE	8,4	10,3	14,4	13,0	15,5	13,7	13,7	13,0	8,8	10,4	8,7	9,4	9,3	9,3	8,9	9,1	13,0	13,0	11,2	10,6		
22	<i>Philophthalmus gralli</i> JQ627832 PE	13,3	14,7	15,7	8,3	15,1	13,9	13,9	12,5	12,9	13,7	12,2	13,2	14,0	12,9	12,9	12,6	8,2	8,2	11,7	11,5	11,5	
23	<i>Philophthalmus gralli</i> JQ627832 PE	25,3	26,1	26,0	25,5	23,9	24,5	24,5	24,5	24,9	24,9	24,4	25,4	26,0	25,1	25,6	24,7	25,5	25,6	25,7	25,8	25,7	25,0

TABELA 17- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene nuclear *Cox-1* de *Renifer* sp. obtida no presente estudo (em negrito) e sequências de outros representantes de Plagiorchioidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <b><i>Renifer</i> sp.</b>								
2 <i>Paralechriorchis syntomentera</i> MW042982 EUA	8,6							
3 <i>Paralechriorchis syntomentera</i> MW042981 EUA	8,6	0,0						
4 <i>Paralechriorchis syntomentera</i> MW042980 EUA	8,6	0,0	0,0					
5 <i>Paralechriorchis syntomentera</i> MW042979 EUA	8,6	0,0	0,0	0,0				
6 <i>Paralechriorchis</i> cf. <i>syntomentera</i> MW042997 EUA	9,6	10,2	10,2	10,2	10,2			
7 <i>Paralechriorchis</i> cf. <i>syntomentera</i> MW042996 EUA	9,6	10,2	10,2	10,2	10,2	0,0		
8 <i>Plagiorchis</i> sp. LC599793 JP	17,0	16,1	16,1	16,1	16,1	14,1	14,1	
9 <i>Philophthalmus lucipetus</i> KX672828 PT	26,1	26,1	26,1	26,1	26,1	22,9	22,9	21,2

TABELA 18- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre o gene nuclear 28S das amostras de *Crassiphiala* sp. obtidas no presente estudo (em negrito) e seqüências de outros Plagiorchioidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	<b>Crassiphiala sp.</b>																					
2	<i>Alaria alata</i> AF184263 EUA	6,5																				
3	<i>Alaria mustelae</i> JF820605 EUA	6,1	1,2																			
4	<i>Austrodiplostomum mordax</i> MH373582 MX	6,4	5,7	5,1																		
5	<i>Austrodiplostomum ostrowskiae</i> KT728780 EUA	6,6	5,6	5,1	1,1																	
6	<i>Bolbophorus damnificus</i> AF470570 EUA	7,4	6,2	5,8	7,3	7,5																
7	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 1 MN200253 EUA	1,1	5,7	5,2	5,8	6,1	6,9															
8	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 2 MN200254 EUA	0,2	6,3	5,8	6,1	6,4	7,1	0,9														
9	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 3 MN200257 EUA	0,4	6,4	6,0	6,3	6,5	7,3	1,1	0,2													
10	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 4 MN200258 BR	2,4	5,4	5,0	5,7	6,2	5,7	2,2	2,2	2,4												
11	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 4 MN200260 BR	2,4	5,5	5,1	5,7	6,2	5,7	2,2	2,2	2,4	0,0											
12	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 5 MN200261 BR	0,0	6,3	5,8	6,3	6,4	7,1	1,1	0,2	0,4	2,3	2,3										
13	<i>Diplostomum pseudospathaceum</i> KR269766 CT	6,2	3,9	4,0	4,6	4,7	6,7	5,2	5,7	5,8	5,1	5,1	5,8									
14	<i>Diplostomum spathaceum</i> KR269765 CT	5,9	4,0	3,9	4,5	4,6	6,6	4,9	5,4	5,6	4,8	4,8	5,6	0,2								
15	<i>Hysteromorpha triloba</i> MF398336 MX	5,8	4,7	4,4	5,9	5,8	6,4	5,5	5,5	5,7	4,7	4,7	5,5	4,7	4,7							
16	<i>Neodiplostomum americanum</i> KY851307 EUA	7,9	5,3	5,4	7,1	7,0	7,9	7,4	7,7	7,8	7,0	7,0	7,6	6,2	6,1	5,6						
17	<i>Posthodiplostomum brevicaudatum</i> KX931426 CT	6,5	6,5	6,2	6,5	6,6	6,2	6,1	6,3	6,4	5,6	5,6	6,3	7,0	7,0	6,5	8,2					
18	<i>Posthodiplostomum</i> sp. MF398331 MX	5,5	5,4	5,2	5,4	5,7	5,6	5,2	5,3	5,3	4,9	5,0	5,3	6,0	6,1	5,6	6,8	2,5				
19	<i>Tylodelphys immer</i> MH521252 CA	7,1	5,2	4,8	2,0	1,9	7,2	6,1	6,7	6,9	6,1	6,1	6,9	5,0	5,1	6,1	6,9	6,4	5,5			
20	<i>Uvulifer</i> sp. 4 MK604825 AS	2,9	5,6	5,0	5,8	6,2	6,3	2,6	2,7	2,9	2,2	2,2	2,8	5,0	4,9	5,4	7,0	5,8	5,2	6,0		
21	<i>Uvulifer</i> sp. MF398332 MX	3,0	5,2	4,8	5,9	5,9	5,7	2,7	2,7	2,9	2,2	2,2	2,9	4,9	4,7	4,9	6,5	5,4	4,9	6,0	1,4	
22	<i>Uvulifer spinatus</i> MF568582 MX	3,1	5,2	4,8	6,0	6,0	5,7	2,8	2,8	3,0	2,3	2,3	3,0	5,0	4,7	4,9	6,5	5,5	5,0	6,1	1,4	0,1

TABELA 19- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre o gene nuclear ITS1-5.8S-ITS2 das amostras de *Crassiphiala* sp. obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Plagiorchioidea disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	<b><i>Crassiphiala</i> sp. (Cercária)</b>																										
2	<b><i>Crassiphiala</i> sp. (Metacercária)</b>	0,1																									
3	<i>Alaria americana</i> MH521246 CA	14,8	14,8																								
4	<i>Alaria mustelae</i> JF820609 EUA	14,1	14,1	3,1																							
5	<i>Austrodiplostomum ostrowskiae</i> KT728776 EUA	16,3	16,3	10,6	11,3																						
6	<i>Austrodiplostomum ostrowskiae</i> KT728782 EUA	16,3	16,3	10,6	11,3	0,0																					
7	<i>Diplostomum baeri</i> AY123042 EUA	15,7	15,7	8,9	9,0	11,6	11,6																				
8	<i>Diplostomum mergi</i> JX494233 DK	16,8	16,8	9,5	9,4	11,5	11,5	3,5																			
9	<i>Diplostomum phoxini</i> MT990746 FI	16,5	16,5	9,3	9,8	11,9	11,9	1,2	3,6																		
10	<i>Diplostomum pseudospathaceum</i> MG780487 CN	16,4	16,4	9,7	10,0	11,9	11,9	2,2	4,1	2,2																	
11	<i>Hysteromorpha triloba</i> JF769486 CA	15,4	15,4	13,0	12,8	15,0	15,0	13,3	13,6	13,6	13,1																
12	<i>Hysteromorpha triloba</i> MG649487 MX	16,6	16,6	13,5	13,3	15,4	15,4	13,4	13,9	13,7	13,3	0,0															
13	<i>Neodiplostomum cf. cratera</i> OL799074 EUA	15,2	15,2	10,1	10,2	13,0	13,0	10,3	11,0	10,8	11,0	14,4	14,5														
14	<i>Neodiplostomum cf. lucidum</i> OL799077 EUA	15,0	15,0	10,3	10,3	13,1	13,1	10,4	11,2	11,0	11,1	14,5	14,6	0,1													
15	<i>Neodiplostomum cf. lucidum</i> OL799078 EUA	15,1	15,1	10,2	10,2	13,0	13,0	10,3	11,1	10,9	11,0	14,4	14,5	0,0	0,1												
16	<i>Neodiplostomum sp.</i> OL799096 EUA	15,5	15,6	10,2	10,4	12,9	12,9	10,7	10,9	11,0	10,8	14,2	14,6	4,7	4,8	4,7											
17	<i>Pharyngostomum cordatum</i> KJ137229 CN	16,5	16,5	11,8	11,6	14,8	14,8	12,0	12,2	12,8	12,4	15,3	15,6	6,4	6,5	6,4	6,1										
18	<i>Pharyngostomum cordatum</i> KJ137230 CN	16,6	16,6	11,9	11,7	14,9	14,9	12,0	12,2	12,8	12,4	15,4	15,7	6,4	6,5	6,4	5,9	0,8									
19	<i>Pharyngostomum cordatum</i> KJ137231 CN	16,5	16,5	12,2	12,1	15,1	15,1	12,2	12,5	13,0	12,6	15,6	15,9	6,6	6,7	6,6	6,4	1,0	0,4								
20	<i>Posthodiplostomum nanum</i> MH358392 BR	14,8	14,8	16,2	16,3	17,6	17,6	17,8	17,5	18,1	17,8	18,7	19,8	17,5	17,4	17,5	17,1	17,5	17,6	17,8							
21	<i>Posthodiplostomum sp.</i> 6 HM064960 CA	13,5	13,5	14,7	15,2	17,5	17,5	15,9	16,4	16,2	16,0	17,5	18,7	15,5	15,4	15,5	15,5	16,6	16,8	17,0	8,0						



TABELA 20- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene mitocondrial *Cox-1* (reigião pós barcode) das amostras de *Crassiphiala* sp. obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Diplostomidae disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
1	<b><i>Crassiphiala</i> sp. C</b>																
2	<b><i>Crassiphiala</i> sp. M</b>	0,0															
3	<i>Crassiphiala</i> Linagem 2 EUA	7,4	6,4														
4	<i>Crassiphiala</i> Linagem 5 BR	2,3	1,5	5,8													
5	<i>Uvulifer</i> sp. MF568661 MX	10,2	9,5	11,9	10,3												
6	<i>Uvulifer</i> sp. MF568664 MX	10,2	9,5	11,9	10,3	0,0											
10	<i>Uvulifer</i> sp. MF568667 CR	11,3	10,8	11,6	10,6	1,3	1,3										
11	<i>Uvulifer</i> sp. MF568665 NC	11,3	10,8	11,6	10,6	1,3	1,3	1,3									
12	<i>Uvulifer spinatus</i> MF568677 MX	11,1	11,1	12,5	10,6	9,9	9,9	9,9	9,9								
13	<i>Uvulifer spinatus</i> MF568676 MX	11,3	11,4	12,5	10,6	9,7	9,7	9,7	9,7	9,1							
14	<i>Uvulifer spinatus</i> MF615998 MX	12,9	12,3	11,9	13,2	9,4	9,4	9,4	9,4	9,1	9,1						
15	<i>Uvulifer</i> sp. MF568660 MX	14,3	14,5	16,4	14,8	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4					
16	<i>Uvulifer</i> sp. Lineage 1 MF568659 MX	14,3	14,5	16,4	14,8	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4				
17	<i>Posthodiplostomum</i> sp. KF738453 IN	15,2	14,8	16,7	15,6	16,9	16,9	16,9	16,9	17,5	17,5	17,5	17,5	17,8			
18	<i>Bolbophorus damnificus</i> AF470597 EUA	15,7	14,8	15,8	14,5	15,3	15,3	15,3	15,3	16,2	16,2	16,2	16,2	15,6	15,6		
19	<i>Bolbophorus</i> sp. AF470563 EUA	15,1	14,5	15,4	15,8	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	13,7	15,1	15,1	15,1	
20	<i>Alaria alata</i> HM022223 AL	15,4	15,1	16,1	14,8	13,7	13,7	13,7	13,7	13,4	13,4	13,4	13,4	15,3	15,3	15,3	15,3

TABELA 21- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene mitocondrial *Cox-1* (região barcode) das amostras de *Crassiphiala* sp. obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Diplostomidae disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1	<b><i>Crassiphiala</i> sp. MN179323 BR</b>																		
2	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 1 MN193951 EUA	14,8																	
3	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 2 MN193953 EUA	12,3	11,8																
4	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 2 MN193952 EUA	12,8	11,7	0,2															
5	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 3 MN193956 EUA	15,3	16,1	12,7	13,0														
6	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 4 MN193958 EUA	17,3	14,8	15,3	15,8	19,5													
7	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 5 MN193959 BR	3,3	13,9	10,7	11,0	12,7	15,9												
8	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 5 MN193960 BR	3,5	13,9	10,9	11,2	13,0	16,1	0,5											
9	<i>Uvulifer weberi</i> MK871335 BR	16,9	15,4	16,4	17,0	17,0	15,0	14,8	15,0										
10	<i>Uvulifer prosocotyle</i> MK871334 BR	16,7	16,0	15,3	16,5	15,9	13,2	15,2	15,4	9,3									
11	<i>Uvulifer prosocotyle</i> HM064721 CA	16,7	16,0	15,3	16,5	15,9	13,2	15,2	15,4	9,3	0,0								
12	<i>Ornithodiplostomum</i> sp. 8 MH368944 CA	19,7	18,6	17,6	19,4	21,3	20,4	19,2	19,2	18,6	18,8	18,8							
13	<i>Ornithodiplostomum</i> sp. 3 MF124280 CA	20,3	18,6	18,1	20,0	21,1	20,0	19,6	20,0	17,8	18,9	18,9	11,6						
14	<i>Ornithodiplostomum scardinii</i> KX931425 CT	19,9	18,6	17,2	18,7	20,2	19,6	19,2	19,2	17,6	18,7	18,7	11,2	11,5					
15	<i>Posthodiplostomum centrarchi</i> MH581291 CA	18,9	18,9	18,7	18,9	20,0	18,3	18,7	18,9	16,5	16,9	16,9	16,5	16,1	15,5				
16	<i>Posthodiplostomum nanum</i> MH355582 BR	20,5	20,3	17,1	18,5	20,7	18,8	20,2	20,3	19,6	19,0	19,0	16,6	16,4	16,2	16,5			
17	<i>Mesoophorodiplostomum pricei</i> HM064863 CA	21,3	19,1	17,5	19,2	20,4	20,2	20,2	20,8	18,8	19,0	19,0	17,0	16,1	17,3	15,6	15,1		
18	<i>Posthodiplostomum</i> sp. 7 HM064865 CA	20,3	19,7	17,2	18,3	20,5	19,2	18,7	18,9	19,4	21,6	21,6	16,8	17,6	16,7	17,3	17,7	17,5	
19	<i>Apharyngostrigea cornu</i> JX977778 MX	18,9	16,9	15,2	16,0	19,1	18,4	19,3	19,5	18,0	16,7	16,7	21,8	21,2	21,4	19,7	20,6	20,8	19,7

TABELA 22- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene nuclear 28S da sequência de Diplostomidae gen. sp. obtida no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Diplostomidae disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1	<b>Diplostomidae gen. sp.</b>																								
2	<i>Alaria alata</i> AF184263 UC	4,1																							
3	<i>Alaria mustelae</i> JF820607 EUA	3,5	1,3																						
4	<i>Australapatemon</i> sp. MF124269 CA	6,4	5,9	6,0																					
5	<i>Austrodiplostomum compactum</i> MH373586 BR	5,5	5,6	5,2	6,4																				
6	<i>Bolbophorus damnificus</i> AF470570 EUA	5,9	6,4	5,8	7,4	7,0																			
7	<i>Braunina cordiformis</i> KM258670 AR	13,8	13,6	13,8	14,5	14,3	14,6																		
8	<i>Cardiocephaloides longicollis</i> MN820662 UC	4,6	4,4	4,1	6,4	5,9	5,5	5,3																	
9	<i>Cardiocephaloides physalis</i> MN820665 CL	5,2	5,0	4,6	6,8	6,3	6,0	5,6	7,4																
10	<i>Codonocephalus urniger</i> MN250790 UC	5,7	5,2	5,1	6,1	6,2	6,2	6,5	7,3	7,5															
11	<i>Cotylurus cornutus</i> KY513180 NO	5,8	5,6	5,3	6,1	6,4	6,7	6,5	7,4	7,4	7,4														
12	<i>Cotylurus marcogliesei</i> MH521248 CA	5,8	5,6	5,3	6,1	6,2	6,6	6,4	7,3	7,3	7,2	6,5													
13	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 2 MN200256 EUA	5,3	6,1	5,7	7,0	6,4	6,6	5,2	7,1	7,0	6,3	6,8	14,4												
14	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 1 MN200252 EUA	5,2	5,5	5,1	6,5	5,9	6,1	4,7	6,6	6,7	6,0	6,5	14,2	5,0											
15	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 3 MN200257 EUA	5,7	6,4	6,0	7,4	6,8	6,8	5,5	7,5	7,4	6,5	7,1	14,3	5,6	6,2										
16	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 4 MN200260 EUA	5,0	5,7	5,3	6,2	5,7	6,0	4,8	6,7	6,6	6,1	5,7	14,8	4,8	5,6	6,2									
17	<i>Crassiphiala</i> sp. Lineage 5 MN200261 BR	5,6	6,3	5,9	7,0	6,4	6,8	5,4	7,2	7,1	6,4	7,0	14,7	5,6	6,2	7,1	7,3								
18	<i>Cyathocotyle bushiensis</i> MK650440 EUA	14,7	14,3	14,1	14,8	14,6	14,5	13,6	15,1	14,6	15,6	15,3	7,7	15,1	15,3	15,0	15,2	14,9							
21	<i>Neodiplostomum americanum</i> KY851307 EUA	5,4	5,5	5,6	6,4	6,5	6,4	6,4	7,0	6,9	7,1	8,0	14,9	6,4	7,2	6,7	7,3	7,0	7,5						
22	<i>Neodiplostomum</i> cf. <i>cratera</i> OL799099 EUA	2,2	3,2	3,1	5,1	4,8	4,3	4,6	6,0	6,0	4,5	5,8	14,1	3,7	4,0	5,4	5,6	5,5	5,3	5,2					
23	<i>Neodiplostomum</i> cf. <i>lucidum</i> OL799102 EUA	2,2	3,2	3,1	5,1	4,8	4,3	4,6	6,0	6,0	4,5	5,8	14,1	3,7	4,0	5,4	5,6	5,5	5,3	5,2	5,4				
24	<i>Neodiplostomum microcotyle</i> OL799079 EUA	2,6	3,6	3,6	5,4	5,2	4,7	5,0	6,4	6,4	5,1	6,0	14,5	4,0	4,4	5,6	5,6	5,5	5,8	5,5	6,1	5,3			
25	<i>Neodiplostomum reflexum</i> OL799091 EUA	2,2	3,2	3,1	5,1	4,8	4,3	4,6	6,0	6,0	4,5	5,8	14,1	3,7	4,0	5,4	5,6	5,5	5,3	5,2	5,4	4,9	5,5		
26	<i>Neodiplostomum</i> sp. OL799096 EUA	2,4	3,6	3,3	5,7	5,3	4,8	5,0	6,5	6,5	5,4	6,0	14,6	3,7	4,1	5,6	5,7	5,5	5,6	5,1	5,8	5,1	5,7	14,8	
27	<i>Neodiplostomum vaucheri</i> OL799108 EUA	2,4	3,5	3,4	5,5	5,1	4,6	4,7	6,4	6,4	5,1	5,9	14,2	3,6	4,3	5,4	5,3	5,3	5,3	5,0	5,6	4,8	5,5	14,5	14,2

TABELA 23- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) da sequência de Diplostomidae gen. sp. obtida no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Diplostomidae disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	<b>Diplostomidae gen. sp.</b>																						
2	<i>Crassiphiala</i> sp. BR	17,6																					
3	<i>Hysteromorpha triloba</i> HM064926 CA	14,7	13,5																				
4	<i>Hysteromorpha triloba</i> HM064927 MX	14,7	13,5	13,5																			
5	<i>Hysteromorpha triloba</i> JF769486 CA	14,3	13,0	12,9	13,1																		
6	<i>Hysteromorpha triloba</i> MG649487 MX	14,7	13,5	13,4	13,4	17,5																	
7	<i>Neodiplostomum</i> cf. <i>cratera</i> OL799074 EUA	9,2	10,0	10,4	9,5	14,5	13,7																
8	<i>Neodiplostomum</i> cf. <i>lucidum</i> OL799077 EUA	9,3	10,1	10,5	9,6	14,6	13,8	15,6															
9	<i>Neodiplostomum</i> cf. <i>lucidum</i> OL799078 EUA	9,2	10,0	10,4	9,5	14,5	13,7	15,5	13,7														
10	<i>Neodiplostomum</i> sp. OL799096 EUA	9,3	10,5	10,8	9,6	14,4	13,5	15,4	13,9	13,9													
11	<i>Ornithodiplostomum scardinii</i> MW001051 DK	17,4	14,5	14,7	13,6	14,8	14,0	15,8	17,3	17,3	17,3												
12	<i>Parastrigea cincta</i> JX977817 MX	17,1	14,3	14,0	13,1	6,8	7,0	7,2	17,5	17,5	17,5	17,5											
13	<i>Parastrigea diovadena</i> JX977809 MX	17,3	14,7	14,4	13,5	6,7	7,0	7,3	17,4	17,4	17,4	17,4	18,3										
14	<i>Parastrigea plataleae</i> JX977836 MX	17,2	14,7	14,4	13,5	7,1	7,2	7,7	17,6	17,6	17,6	17,6	18,2	18,2									
15	<i>Parastrigea robusta</i> MF537208 AL	17,0	13,6	13,8	12,1	6,0	6,0	7,6	17,5	17,5	17,5	17,5	16,8	16,8	15,6								
16	<i>Pharyngostomum cordatum</i> KJ137229 CN	10,4	11,7	11,8	11,2	14,9	14,4	16,1	15,5	15,5	15,5	15,5	15,8	15,8	12,1	12,3							
17	<i>Pharyngostomum cordatum</i> KJ137230 CN	10,2	11,8	11,9	11,3	15,3	14,8	16,4	15,6	15,6	15,6	15,6	16,1	16,1	12,1	12,3	12,7						
18	<i>Pharyngostomum cordatum</i> KJ137231 CN	10,6	12,1	12,2	11,6	15,5	15,0	16,6	15,8	15,8	15,8	15,8	16,3	16,3	12,4	12,7	13,0	12,9					
19	<i>Posthodiplostomum nanum</i> MH358392 BR	18,3	16,0	16,5	14,4	16,1	16,1	17,3	17,8	17,8	17,8	17,8	19,4	19,4	17,5	17,5	17,8	17,5	14,7				
20	<i>Posthodiplostomum</i> sp.6 HM064960 CA	17,0	14,1	14,7	13,1	16,0	14,8	16,9	17,2	17,2	17,2	17,2	17,8	17,8	15,5	15,7	15,7	15,5	12,4	18,4			
21	Strigeidae sp. AY245711 ISR	17,3	14,1	14,2	12,9	2,9	2,8	0,3	17,4	17,4	17,4	17,4	18,3	18,3	16,2	16,6	16,4	16,8	16,2	18,2	18,2		
22	<i>Tylodelphys azteca</i> KT175371 MX	15,9	11,5	11,7	10,8	16,0	14,7	17,0	6,0	6,0	6,0	6,0	17,9	17,9	11,2	11,7	11,4	11,6	15,9	15,7	15,7	15,6	

TABELA 24- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene mitocondrial *Cox-1* da sequência de Diplostomidae gen. sp. obtida no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Diplostomidae disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 <b>Diplostomidae gen. sp.</b>																			
2 <i>Alaria americana</i> MH536507 CA	19,4																		
3 <i>Alaria americana</i> MH581265 CA	19,4	0,0																	
4 <i>Alaria mustelae</i> MH581269 CA	19,6	10,9	10,9																
5 <i>Alaria</i> sp. 2 JF904532 EUA	17,6	9,7	9,7	10,7															
6 <i>Bolbophorus</i> sp. 3 MK605690 AS	20,2	18,0	18,0	19,6	17,6														
7 <i>Cardiocephaloides physalis</i> MW365508 AS	17,0	16,2	16,2	16,2	15,8	16,0													
8 <i>Diplostomum spathaceum</i> MZ323276 UC	17,2	13,9	13,9	14,9	14,9	15,6	16,2												
9 <i>Dolichorchis lacombeensis</i> MZ323298 BR	18,8	15,8	15,8	17,4	15,2	19,8	16,6	15,8											
10 <i>Neodiplostomum americanum</i> KY851304 EUA	17,6	13,9	13,9	13,1	13,3	17,6	15,8	14,7	15,2										
11 <i>Neodiplostomum</i> cf. <i>cratera</i> OL770020 EUA	17,6	13,7	13,7	13,9	14,1	18,2	15,8	13,5	17,0	14,7									
12 <i>Neodiplostomum</i> cf. <i>lucidum</i> OL770032 EUA	17,8	14,3	14,3	13,5	15,0	18,2	16,2	13,7	16,8	15,0	2,0								
13 <i>Neodiplostomum banghami</i> OL770054 EUA	19,0	11,3	11,3	11,7	13,1	16,8	14,9	14,9	16,2	11,3	12,7	12,9							
14 <i>Neodiplostomum microcotyle</i> OL770044 BR	17,6	13,3	13,3	13,3	13,5	19,4	16,4	14,5	16,8	14,3	10,9	11,1	12,9						
15 <i>Neodiplostomum</i> sp. OL770068 EUA	15,6	13,9	13,9	13,3	12,9	17,2	14,1	14,7	17,4	12,9	10,5	10,9	10,3	10,7					
16 <i>Neodiplostomum vaucheri</i> OL770065 EC	17,6	12,3	12,3	12,7	12,3	17,4	14,5	15,4	15,2	12,5	9,1	9,3	11,3	10,7	8,9				
17 <i>Sphincterodiplostomum musculosum</i> MW410855 BR	24,0	17,8	17,8	18,4	19,8	23,6	20,6	19,2	18,8	20,0	17,0	17,4	19,0	19,2	19,4	18,0			
18 <i>Tylodelphys immer</i> MH536513 CA	18,2	14,9	14,9	14,7	14,5	16,8	15,0	14,1	17,2	14,7	14,3	14,7	13,7	13,7	12,9	13,3	20,0		
19 <i>Hysteromorpha triloba</i> JF769473 CA	20,9	14,0	14,0	15,0	13,7	19,0	17,1	14,4	17,3	15,4	14,0	13,7	14,4	15,0	12,9	14,8	17,8	15,0	
20 <i>Apharyngostrigea pipientis</i> MT943786 AR	19,6	18,8	18,8	18,4	18,0	19,0	16,2	18,0	20,0	16,8	18,2	18,4	17,6	17,2	14,7	15,4	22,8	17,6	19,2

TABELA 25- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais da região transcrita interna (ITS) das amostras de *Apharyngostrigea pipientis* obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Strigeidae disponíveis no GenBank

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	<b><i>Apharyngostrigea pipientis</i></b>																				
2	<i>Apatemon fuligulae</i> MW244656 PL	7,0																			
3	<i>Apharyngostrigea pipientis</i> MT974151 BR	0,0	7,0																		
4	<i>Apharyngostrigea pipientis</i> HM064966 CA	0,1	6,8	0,1																	
5	<i>Apharyngostrigea cornu</i> JX977837 MX	0,0	7,0	0,0	0,1																
6	<i>Apharyngostrigea cornu</i> JX977838 MX	0,0	7,0	0,0	0,1	0,0															
7	<i>Apharyngostrigea cornu</i> JX977839 MX	0,0	7,0	0,0	0,1	0,0	0,0														
8	<i>Apharyngostrigea cornu</i> JX977840 CA	0,2	7,0	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2													
9	<i>Apharyngostrigea simplex</i> MK510081 AR	5,3	9,9	5,3	3,0	4,5	4,5	4,5	4,5												
10	<i>Apharyngostrigea</i> sp. MN179273 BR	2,8	8,1	2,9	2,8	3,0	3,0	3,0	3,0	3,1											
11	<i>Australapatemon burti</i> KY207626 CA	7,5	1,0	7,5	6,9	7,5	7,5	7,5	7,5	9,9	8,7										
12	<i>Australapatemon niewiadomski</i> KT334175 NZ	6,6	1,3	6,6	6,7	6,6	6,6	6,6	6,5	9,5	7,7	1,4									
13	<i>Australapatemon</i> sp. MW001127 DK	6,1	4,4	6,2	5,8	6,6	6,6	6,6	6,4	10,5	7,8	4,3	3,8								
14	<i>Cotylurus</i> sp. MT276343 AR	15,5	15,8	15,8	14,5	15,8	15,8	15,8	15,7	18,0	17,0	16,4	13,6	15,2							
15	<i>Parastrigea brasiliiana</i> MT276343 MX	1,4	7,2	1,5	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	3,5	3,0	7,7	6,6	6,9	15,8						
16	<i>Parastrigea brasiliiana</i> MZ614718 MX	1,4	7,2	1,5	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	3,5	3,0	7,7	6,6	6,9	15,8	0,0					
17	<i>Parastrigea cincta</i> JX977817 MX	6,6	9,0	6,7	7,0	6,6	6,6	6,6	6,8	8,8	7,2	9,2	8,2	8,6	16,9	7,4	7,4				
18	<i>Parastrigea diovadena</i> JX977815 MX	6,5	9,3	6,6	7,0	6,5	6,5	6,5	6,7	8,9	7,3	9,5	8,6	8,8	17,2	7,5	7,5	0,6			
19	<i>Parastrigea plataleae</i> JX977836 MX	6,9	9,2	6,9	7,2	6,9	6,9	6,9	7,1	9,1	7,8	9,4	8,4	8,5	17,2	7,5	7,5	1,2	1,3		
20	<i>Strigea robusta</i> MF537205 AL	5,6	9,2	5,9	6,0	6,0	6,0	6,0	6,2	9,8	6,9	9,6	8,4	7,6	16,2	6,6	6,6	7,1	7,1	7,4	
21	<i>Tylodelphys azteca</i> KT175385 MX	15,5	15,6	15,6	14,9	15,7	15,7	15,7	15,8	18,6	16,2	16,0	15,0	15,3	16,9	15,9	15,9	16,4	16,7	17,1	17,3

TABELA 26- Estimativas de divergência evolutiva (distância p não-corrigida, expressa em porcentagem) entre sequências parciais do gene mitocondrial *Cox-I* (região barcode) das amostras de *Apharyngostrigea pipientis* obtidas no presente estudo (em negrito) e sequências de outros Diplostomidae disponíveis no GenBank

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	<b><i>Apharyngostrigea pipientis</i></b>																									
2	<i>Apatemon</i> sp. HM064636 CA	14,5																								
3	<i>Apatemon</i> sp. 3 HM064644 CA	14,3	10,4																							
4	<i>Apharyngostrigea pipientis</i> HM064883 CA	0,0	14,6	14,4																						
5	<i>Apharyngostrigea pipientis</i> HM064884 CA	1,4	14,8	14,5	1,4																					
6	<i>Apharyngostrigea pipientis</i> HM064885 CA	1,4	14,8	14,5	1,4	0,0																				
7	<i>Apharyngostrigea pipientis</i> HM064886 CA	0,2	14,8	14,5	0,2	1,2	1,2																			
8	<i>Apharyngostrigea pipientis</i> MT943784 CA	1,5	14,0	14,3	1,5	0,0	0,0	1,3																		
9	<i>Apharyngostrigea pipientis</i> HM064887 CA	0,0	14,6	14,3	0,0	1,4	1,4	0,2	1,5																	
10	<i>Apharyngostrigea pipientis</i> MT943772 TZA	0,7	15,0	15,0	0,7	1,7	1,7	0,5	1,8	0,7																
11	<i>Apharyngostrigea pipientis</i> MT943785 AR	0,0	14,5	14,3	0,0	1,4	1,4	0,2	1,5	0,0	0,7															
12	<i>Apharyngostrigea cornu</i> JX977778 MX	0,3	14,0	14,2	0,3	1,1	1,1	0,0	1,1	0,3	0,5	0,3														
13	<i>Apharyngostrigea cornu</i> JX977779 MX	0,0	13,7	14,0	0,0	1,3	1,3	0,3	1,3	0,0	0,8	0,0	0,3													
14	<i>Apharyngostrigea cornu</i> JX977777 MX	0,3	14,0	14,2	0,3	1,6	1,6	0,5	1,6	0,3	1,1	0,3	0,5	0,3												
15	<i>Apharyngostrigea cornu</i> JX977780 MX	7,1	15,0	15,0	7,1	6,6	6,6	6,9	6,6	7,1	7,4	7,1	6,9	7,1	7,4											
16	<i>Apharyngostrigea cornu</i> JF769451 CA	8,6	16,2	15,7	8,4	8,3	8,3	8,3	8,0	8,6	8,6	8,6	7,7	7,9	8,2	9,0										
17	<i>Apharyngostrigea cornu</i> JF769450 CA	8,2	15,5	15,9	8,0	8,0	8,0	8,0	7,8	8,2	8,2	8,2	7,4	7,7	7,9	8,4	1,0									
18	<i>Apharyngostrigea simplex</i> MK570088 AR	14,0	15,7	15,5	14,1	13,6	13,6	14,0	13,0	14,1	14,5	14,0	13,2	13,2	13,5	12,4	12,4	11,8								
19	<i>Apharyngostrigea</i> sp. MH777791 BR	13,6	15,8	15,1	13,7	13,6	13,6	13,6	13,1	13,7	13,6	13,6	12,7	12,7	13,0	12,2	11,9	11,4	1,7							
20	<i>Australapatemon mclaughlini</i> KY587405 CA	15,2	14,8	14,5	15,3	15,2	15,2	15,2	15,5	15,3	15,7	15,2	16,1	16,1	16,4	16,4	16,4	16,2	15,7	15,1						
21	<i>Australapatemon</i> sp. KY207596 CA	15,3	14,6	11,5	15,1	15,3	15,3	15,3	15,3	15,3	15,8	15,3	15,3	15,3	15,6	15,9	15,8	15,5	16,2	16,3	11,5					

### ANEXO 3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA NO PERÍODO 2018-2022

- 1- Brandão M, **López-Hernández D**, Alves PV, Moreira, N & Pinto HA 2022. Size does not matter: molecular phylogeny reveals one of the largest trematodes from vertebrates, the enigmatic *Ithyoclinostomum dimorphum*, as a species of *Clinostomum* (Trematoda: Clinostomidae). *International Journal for Parasitology*.
- 2- Pinto HA, Cruz OM, **López-Hernández D**, Mati VL & Martins NR 2022. Acute infection with *Platynosomum illiciens* (Trematoda: Dicrocoeliidae) as a clinically relevant and potentially fatal disease in *Falco sparverius* (Aves: Falconidae) in Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 31: 100726.
- 3- Valadão MC, **López-Hernández D**, Alves PV & Pinto HA 2022. A new species of *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) from the ‘*revolutum*’ group found in Brazil: refuting the occurrence of *Echinostoma miyagawai* (= *E. robustum*) in the Americas. *Parasitology* 149: 325-336.
- 4- Assis JC, **López-Hernández D**, Favoretto S, Medeiros LB, Melo AL, Martins NR, & Pinto HA 2021. Identification of the avian tracheal trematode *Typhlocoelum cucumerinum* (Trematoda: Cyclocoelidae) in a host parasite environment system: diagnosis, life cycle and molecular phylogeny. *Parasitology* 148: 1383-1391.
- 5- Locke AS, Drago FB, **López-Hernández D**, Chibwana F, Núñez V, Van Dam A, Achinelly MF, Johnson PTJ, Alves JCA, Melo AL & Pinto, HA 2021 Intercontinental distributions, phylogenetic position and life cycles of species of *Apharyngostrigea* (Digenea, Diplostomoidea) illuminated with morphological, experimental, molecular and genomic data. *International Journal for Parasitology*.
- 6- Queiroz M, Alves PV, **López-Hernández D**, Anjos LA & Pinto HA 2021. Exploring Neotropical anuran parasites: a morphological, life cycle and phylogenetic study of *Catadiscus marinholutzi* (Trematoda: Diplodiscidae). *Parasitology*:1-40.
- 7- Lopes AS, Pulido-Murillo EA, **López-Hernández D**, Melo Al & Pinto HA 2021. First report of *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) harboring a xiphidiocercaria in Brazil: A new parasite introduced in the Americas? *Parasitology International* 82: 102284.
- 8- Alves PV, Assis JCA, **López-Hernández D**, Pulido-Murillo EA, Melo AL, Locke AS & Pinto HA 2020. A phylogenetic study of the cecal amphistome *Zygocotyle lunata* (Trematoda: Zygocotylidae), with notes on the molecular systematics of Paramphistomoidea. *Parasitology Research* 119: 2511-2520.
- 9- **López-Hernández D**, Locke AS, Assis JCA, Drago FB, Melo AL, Leite E & Pinto HA 2019. Molecular, morphological and experimental-infection studies of cercariae of five species in the superfamily Diplostomoidea (Trematoda: Digenea) infecting *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) in Brazil. *Acta Tropica* 199: 105082-11.

10- Assis JCA, **López-Hernández D**, Pulido-Murillo EA, Melo AL & Pinto HA 2019. A morphological, molecular and life cycle study of the capybara parasite *Hippoecrepis hippoecrepis* (Trematoda: Notocotylidae). *PLoS One* 14: e0221662.

11- Queiroz MS, **López-Hernández D**, Locke AS, Pinto HA & Anjos LA 2019. Metacercariae of *Heterodiplostomum lanceolatum* (Trematoda: Proterodiplostomidae) found in *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae) from Brazil: a morphological, molecular and ecological study. *Journal of Helminthology* 2: 1-8.

12- Pinto HA, Goncalves N, **López-Hernández D**, Pulido-Murillo EA & Melo AL 2018. The life cycle of a zoonotic parasite reassessed: Experimental infection of *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) with *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae). *PLoS One* 13: e0194161-13.

13- **López-Hernández D**, Locke AS, Rabelo EM, Melo AL & Pinto HA 2018. Molecular, morphological and experimental assessment of the life cycle of *Posthodiplostomum nanum* Dubois, 1937 (Trematoda: Diplostomidae) from Brazil, with phylogenetic evidence of the paraphyly of the genus *Posthodiplostomum* Dubois, 1936. *Infection Genetics and Evolution* 63: 95-103.

14- Locke SA, Van Dam A, Caffara M, Pinto HA, **López-Hernández D** & Blanar CA 2018. Validity of the Diplostomoidea and Diplostomida (Digenea, Platyhelminthes) upheld in phylogenomic analysis. *International Journal for Parasitology*:1043-1059.

15- Valadão MC, Silva BM, **López-Hernández D**, Araujo J, Locke AS & Pinto HA 2018. A molecular phylogenetic study of the caecal fluke of poultry, *Postharmostomum commutatum* (= *P. gallinum*) (Trematoda: Brachylaimidae). *Parasitology Research*: 3927-3934.

#### Artigos submetidos para publicação

1. **López-Hernández D**, Valadão M, Melo AL, Tkach V & Pinto, HA. Elucidating the life cycle of opossum parasites: molecular sequences reveal the involvement of planorbid snails as intermediate hosts of *Rhopalium* spp. (Trematoda: Echinostomatidae) in Brazil.

2. **López-Hernández D**, Pimenta Leibowitz M, Pinto HA & Carlos Augusto Gomes Leal *Crassiphiala* sp. (Trematoda: Diplostomidae) as an etiological agent of black spot disease in commercial ornamental fish from Brazil.