

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Eduardo Alberto Pulido Murillo

**Trematódeos transmitidos por moluscos gastrópodes no Rio São  
Francisco em Januária, Minas Gerais, Brasil**

Belo Horizonte

2022

Eduardo Alberto Pulido Murillo

**Trematódeos transmitidos por moluscos gastrópodes no Rio São  
Francisco em Januária, Minas Gerais, Brasil**

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

Área de concentração: Helmintologia  
Orientador: Prof. Dr. Hudson Alves  
Pinto

Belo Horizonte

2022

043

Murillo, Eduardo Alberto Pulido.

Trematódeos transmitidos por moluscos gastrópodes no Rio São Francisco em Januária, Minas Gerais, Brasil [manuscrito] / Eduardo Alberto Pulido Murillo. – 2022.

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

Orientador: Prof. 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. Trematódeos. 4. Gastrópodes. 5. Taxonomia. 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**

**"TREMATÓDEOS TRANSMITIDOS POR MOLUSCOS GASTRÓPODES NO RIO SÃO FRANCISCO EM  
JANUÁRIA, MINAS GERAIS, BRASIL"**

**ALUNO: EDUARDO ALBERTO PULIDO MURILLO**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **11 de março de 2022**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

**Cláudia Portes Santos Silva**

(Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ)

**Edson Lourenço da Silva**

(Instituto Federal do Piauí/IFPI)

**Luciano Alves dos Anjos**

(Universidade Estadual de São Paulo/Unesp)

**Silvana Aparecida Rogel Carvalho Thiengo**

(FIOCRUZ/RJ)

**Hudson Alves Pinto - Orientador**

(UFMG)



Belo Horizonte, 11 de março de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Hudson Alves Pinto, Professor do Magistério Superior**, em 11/03/2022, às 16:23, 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 **Edson Lourenço da Silva, Usuário Externo**, em 11/03/2022, às 17:12, 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 **Cláudia Portes Santos Silva, Usuária Externa**, em 12/03/2022, às 13:52, 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 **Luciano Alves dos Anjos, Usuário Externo**, em 14/03/2022, às 09:20, 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 **Silvana Aparecida Rogel Carvalho Thiengo, Usuária Externa**, em 15/03/2022, às 15:12, 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 **1290354** e o código CRC **462DB104**.

*Ao doutor Manuel Edmundo Tantaleán Vidaurre  
(in memoriam), professor, amigo e exemplo na  
vida acadêmica pela humildade e paixão pela  
Helminologia*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família pelo suporte nesta jornada. Aos meus pais, Miria Murillo Loayza e Esteban Pulido Horna, pelo constante apoio e motivação para poder culminar esta fase. Às minhas irmãs, Katherine, Melissa e Karen, pela companhia, ajuda e conselhos.

Ao professor Hudson Alves Pinto, pela orientação, prestabilidade, compreensão, e sobretudo, por me permitir conhecer sobre a taxonomia de larvas de trematódeos.

Aos colegas do Laboratório de Biologia de Trematoda, André Schultz, Danimar López, Jordana Assis, Marisa Valadão, Núbia Araújo e Philippe Alves, pela ajuda, ensinamentos e conhecimentos e momentos compartilhados.

Aos membros do Centro Avançado de Tratamento e Pesquisa em Leishmaniose da cidade de Januária, especialmente ao Sr. Jailton Xavier, pelo recebimento e ajuda durante as atividades de campo do presente estudo.

Ao professor Alan Lane de Melo, pelos conselhos e pela identificação de moluscos no presente estudo.

Ao senhor Airton Lobo, pela amabilidade e disposição na preparação e montagem de parasitos.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Parasitologia, pelos conhecimentos transmitidos durante as aulas e contribuição para a minha formação acadêmica.

Às Sras, Sumara Aparecida Guilherme e Sibebe das Graças Guilherme Abreu, secretárias da Pós-Graduação em Parasitologia pela atenção, constante ajuda e orientação.

Aos professores Adalberto José dos Santos Almir Rogério Pepato, do Departamento de Zoologia da UFMG, pelos ensinamentos nas disciplinas de Filogenia.

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

Aos amigos da turma do mestrado, Agna Guimarães, Leticia Estevam, Gabriela Bessa, Raquel Andrade e Wagner Fontes, por ainda estarem presentes durante esta jornada. Também a Andreina, Fernando Furtado e Francisco Ferreira pela companhia e motivação.

À Caroline Romão e Wesley Carneiro pelo profissionalismo e ajuda.

*Hard times are often blessing in disguise.  
Let go and let life strengthen you.  
No matter how many times you fall,  
hold your head up and keep going.  
This is an important lesson to remember  
when you are having a rough day,  
a bad month, or a crappy year.  
Truth be told, sometimes the hardest lessons  
to learn are the ones your spirit needs most.  
Your past was never a mistake if you learned from it.*

*Anônimo*

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a transmissão de trematódeos digeneicos por moluscos no Rio São Francisco, na cidade de Januária, Minas Gerais, Brasil. Coletas malacológicas foram realizadas nas margens do rio e em coleções aquáticas próximas, entre julho de 2017 e agosto de 2019. Foram coletados e avaliados 11.690 exemplares de moluscos gastrópodes pertencentes a nove espécies. Destes, 369 (3,16%) foram encontrados infectados por larvas de trematódeos. Inicialmente, as cercárias foram estudadas morfológicamente em microscópio óptico para a determinação dos tipos cercarianos. Quando possível, foram realizados estudos de infecção experimental com as larvas visando a obtenção de outros estágios evolutivos (metacercária e adulto). Outros organismos obtidos na mesma área, como larvas de Odonata (n=21), girinos (n=78) e peixes (n=160), também foram avaliados quanto a infecção por trematódeos. Adicionalmente, sequências genéticas dos genes 28S, ITS1-5.8S-ITS2, *cox1* e *nad1* foram obtidas para a maioria das espécies de trematódeos encontradas (29/31), sendo utilizadas para identificação e análises filogenéticas. Esta abordagem taxonômica integrativa revelou a ocorrência de 31 espécies de trematódeos em moluscos gastrópodes na localidade. Nos ambientes lênticos avaliados, a maior diversidade de trematódeos foi verificada em *Biomphalaria straminea*, encontrada atuando como primeiro hospedeiro intermediário de 16 espécies destes parasitos (Aporocotylidae gen. sp. 1, *Austrodiplostomum compactum*, *Clinostomum heluans*, *Cotylurus* sp., *Drepanocephalus* sp., *Echinostoma* sp., Echinostomatidae gen. sp., *Hysteromorpha* sp., Notocotylidae gen. sp., *Parastrigea* sp., *Ribeiroia* sp., Schistosomatidae gen. sp. 1, Schistosomatidae gen. sp. 2, Spirorchiidae gen. sp., *Tylodelphys* sp. e *Zygocotyle lunata*). Em outros dois planorbídeos, Ancylinae gen. sp. e *B. occidentalis*, foram encontradas larvas de *Choledocystus* sp. e Spirorchiidae gen. sp., respectivamente. O tiarídeo nativo *Aylacostoma tuberculatum* foi encontrado infectado por 11 espécies de trematódeos (Aporocotylidae gen. sp. 2, Cryptogonomidae gen. sp., Echinochasmidae gen. sp., Lecithodendriidae gen. sp. 1, Lecithodendriidae gen. sp. 2, *Neocladocystis* sp., Phaneropsolidae gen. sp., *Philophthalmus* sp. nov., *Pseudosellacotyla lutzi*, *Stephanoprora* sp. 1 e *Stephanoprora* sp. 2). Cercárias de quatro espécies de trematódeos (Heterophyidae gen. sp., Lecithodendriidae gen. sp. 1, Phaneropsolidae gen. sp. e *Philophthalmus* sp. nov) foram encontradas em *Aylacostoma chloroticum*. No tiarídeo invasor, *Melanoides tuberculata*, foi detectada a infecção por *Centrocestus*

*formosanus*. Entre os organismos avaliados como potenciais segundos hospedeiros intermediários dos parasitos encontrados nos moluscos, foi detectada a infecção de peixes, *Australoheros* sp. por metacercárias de *A. compactum* e *C. heluans*, e *Myleus pacu* por Cryptogonimidae gen. sp. Além disso, *B. straminea* foi encontrada infectada por *Cotylurus* sp. e Echinostomatidae gen. sp., larvas de Odonata por Phaneropsolidae gen. sp., e girinos de *Rhinella* sp. por metacercária de *Parastrigea* sp. Destaca-se que *Hoplais malabaricus* foi identificado como hospedeiro definitivo de *P. luzzi*. Adicionalmente, foram recuperados estágios evolutivos de outros quatro trematódeos em peixes (*Apharyngostrigea* sp., Crassiphialinae gen. sp., *Posthodiplostomum nanum* e *Neocladocystis intestinalis*), porém, sem identificação dos primeiros hospedeiros intermediários. Desta forma, as diferentes abordagens utilizadas neste estudo possibilitaram caracterizar a ocorrência de uma rica fauna trematódeos no Rio São Francisco, resultando em novos registros de hospedeiros e parasitos, na elucidação de aspectos de ciclos biológicos e na identificação de uma nova espécie de trematódeo. Além disso, os dados moleculares obtidos poderão subsidiar estudos futuros visando avançar o conhecimento sobre a biologia e taxonomia da diversa, mas ainda pouco conhecida fauna de trematódeos que ocorre em ambientes fluviais no Brasil.

Palavras-chave: cercárias, trematódeos, gastrópodes, taxonomia integrativa, Januária, Rio São Francisco.

## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the transmission of digenetic trematodes transmitted by mollusc in the São Francisco River, in Januária city, State of Minas Gerais, Brazil. Malacological surveys were carried out on the riverbank and nearby aquatic collections, between July 2017 and August 2019. A total of 11,690 specimens of gastropod molluscs belonging to nine species were collected and evaluated. From them, 369 (3.16%) were found infected with larval trematodes. Initially, cercariae were studied morphologically under an optical microscope to determine cercarian types. When possible, experimental infection studies were carried out with the larvae in order to obtain other developmental stages (metacercariae and adult). Other organisms from the same area, such as Odonata larvae (n=21), tadpoles (n=78) and fish (n=160), were also examined for infection with trematodes. Additionally, genetic sequences of 28S, ITS1-5.8S-ITS2, *cox1* and *nad1* genes were obtained for most species of trematodes found (29/31), which were used for identification and phylogenetic analysis. This integrative taxonomic approach revealed the occurrence of 31 species of trematodes in gastropod molluscs from the locality. The highest trematode diversity was verified in *Biomphalaria straminea*, which was found infected with 16 species of these parasites (*Aporocotylidae* gen. sp. 1, *Austrodiplostomum compactum*, *Clinostomum heluans*, *Cotylurus* sp., *Drepanocephalus* sp., *Echinostoma* sp., *Echinostomatidae* gen. sp., *Hysteromorpha* sp., *Notocotylidae* gen. sp., *Parastrigea* sp., *Ribeiroia* sp., *Schistosomatidae* gen. sp. 1, *Schistosomatidae* gen. sp. 2, *Spirorchiidae* gen. sp., *Tylodelphys* sp. and *Zygocotyle lunata*). In two other planorbids, *Ancylinae* gen. sp. and *Biomphalaria occidentalis*, it was verified the infection with larvae of *Choledocystus* sp. and *Spirorchiidae* gen. sp., respectively. The native thiarid *Aylacostoma tuberculatum* was found infected with 11 species of trematodes (*Aporocotylidae* gen. sp. 2, *Cryptogonomidae* gen. sp., *Echinochasmidae* gen. sp., *Lecithodendriidae* gen. sp. 1, *Lecithodendriidae* gen. sp. 2, *Neocladocystis* sp., *Phaneropsolidae* gen. sp., *Philophthalmus* sp. nov., *Pseudosellacotyla luzzi*, *Stephanoprora* sp. 1 and *Stephanoprora* sp. 2). Cercariae of four trematode species (*Heterophyidae* gen. sp., *Lecithodendriidae* gen. sp. 1, *Phaneropsolidae* gen. sp. and *Philophthalmus* sp. nov) were found in *Aylacostoma chloroticum*. In the invasive thiarid, *Melanoides tuberculata*, it was detected the infection with *Centrocestus formosanus*. Among the organisms evaluated as potential second intermediate hosts for the parasites



found in molluscs, it was detected in fish, the infection of *Australoheros* sp. with metacercariae of *A. compactum* and *C. heluans*, and *Myleus pacu* with Cryptogonimidae gen. sp. Moreover, *B. straminea* was found infected with metacercariae of *Cotylurus* sp. and Echinostomatidae gen. sp.; Odonata larvae with Phaneropsolidae gen. sp., and tadpoles of *Rhinella* sp. with *Parastrigea* sp. It is also noteworthy that *Hoplias malabaricus* was identified as the definitive host for *P. lutzi*. Additionally, developmental stages of other four trematodes (*Apharyngostrigea* sp., Crassiphialinae gen. sp., *Posthodiplostomum nanum* e *Neocladocystis intestinalis*) were found in fish, however, without identification of their first intermediate hosts. Thus, the different approaches used in this study enable to characterize the occurrence of a rich diversity of trematodes in molluscs in the São Francisco River, resulting in new hosts and parasites records, as well as in the elucidation of aspects of the life cycles and the identification of a new species of trematode. In addition, the molecular data obtained may support future studies aimed at advancing knowledge about the biology and taxonomy of this diverse but still poorly known fauna of trematodes that occurs in river environments from Brazil.

Keywords: cercariae, trematodes, gastropods, integrative taxonomy, Januária, São Francisco River.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número de espécies caracterizadas molecularmente em estudos taxonômicos brasileiros desde 2001 até 2021.....	40
Figura 2 – Uso de marcadores nucleares (18S, 28S, ITS) e mitocondriais ( <i>cox1</i> e <i>nad1</i> ) na caracterização de trematódeos digenéticos em publicações científicas realizadas entre 2001 e 2021 no território brasileiro. ....	40
Figura 3 – Vista aérea dos três pontos de coletas malacológicas (A, B e C) localizados no município de Januária. Fonte: Google Earth.....	44
Figura 4 – Vistas panorâmicas dos pontos de coletas selecionados no município de Januária.....	45
Figura 5 – Moluscos dulciaquícolas coletados no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. ....	60
Figura 6 – <i>Clinostomum heluans</i> . (A) Cercária emergida de <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Detalhe da membrana ondulante no corpo cercariano (C) Furca com microespinhos no tegumento, corada com vermelho neutro. (D) Esporocisto recuperado de molusco infectado. (E) Estágio adulto recuperado de <i>Australoheros</i> sp., corado pelo carmim.....	70
Figura 7 –Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança de representantes da família Clinostomidae, inferida através de <i>cox1</i> (306 bp, modelo evolutivo: HKY + G).....	73
Figura 8 – <i>Austrodiplostomum compactum</i> . (A) Cercária emergida de <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Detalhe do corpo cercariano corado por sulfato azul de Nilo. (C) Detalhe da ventosa ventral com microespinhos. (D) Esporocisto obtido em molusco infectado. (E) Metacercária corada com carmim obtida do globo ocular de um exemplar de <i>Australoheros</i> sp. procedente do ponto C.....	76
Figura 9 –Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança (1141 pb, modelo evolutivo HKY + G) de representantes da subfamília Diplostominae, inferida através do marcador 28S.....	78
Figura 10 – <i>Hysteromorpha</i> sp. (A) Cercária emergida de <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada por sulfato azul do Nilo. (B) Corpo cercariano corado com vermelho neutro. ....	81

Figura 11 – <i>Tylodephys</i> sp. (A) Cercária emergida de <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Região anterior corada pelo vermelho neutro. (C) Detalhe da ventosa ventral com espinhos. (D) Esporocisto obtido de molusco infectado. Metacercária obtida experimentalmente em <i>Poecilia reticulata</i> após 21 dias de infecção, (E) <i>in vivo</i> e (F) corado pelo carmim. ....	86
Figura 12 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança (996 bp, modelo HKY + G) de diplostomídeos, inferida através do marcador 28S. ....	89
Figura 13 – <i>Cotylurus</i> sp. (A) Cercária emergida de <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano corado com sulfato azul do Nilo. (C) Detalhe da ventosa ventral. (D) Esporocisto recuperado de molusco infectado. (E) Metacercária encistada <i>in vivo</i> . ....	92
Figura 14 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança (462 bp, modelo evolutivo GTR + G) espécies do gênero <i>Cotylurus</i> , inferida através do marcador <i>cox1</i> . ....	94
Figura 15 – <i>Parastrigea</i> sp. (A) Cercária emergida de <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Detalhe das glândulas de penetração. (C) Detalhe do tegumento espinhoso na região anterior do corpo cercariano. (D) Microespinhos na abertura da ventosa ventral. (E) Esporocisto encontrado em moluscos infectado. (F) Metacercária obtida de cavidade visceral de girinos de <i>Rhinella</i> sp. ....	97
Figura 16 – Reconstruções filogenéticas obtidas pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para <i>Parastrigea</i> sp., inferidas através dos marcadores ITS1-5.8S-ITS2 (994 bp, modelo evolutivo GTR + G) e <i>cox1</i> (298 bp, modelo evolutivo HKY + G + I). ....	99
Figura 17 – Echinochasmidae gen. sp. (A) Cercária emergida (fixada em formalina) de <i>Aylacostoma tuberculatum</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano. (C) Detalhe das concreções circulares e células cistogênicas em cercária corada com sulfato azul do Nilo. ....	102
Figura 18 – <i>Stephanoprora</i> sp.1. (A) Cercária emergida ( <i>in vivo</i> ) de <i>Aylacostoma tuberculatum</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano corado com vermelho neutro. (C) Espinhos localizados na borda anterior da ventosa oral. (D) Detalhe dos espinhos presentes na abertura da ventosa ventral. (E) Rédia coletada em molusco infectado. ....	106

Figura 19 – <i>Stephanoprora</i> sp. 2 (A) Cercária emergida ( <i>in vivo</i> ) de <i>Aylacostoma tuberculatum</i> coletado no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano corado com Vermelho Neutro. (C) Espinhos localizados na borda anterior da ventosa oral. (D) Abertura da ventosa ventral com espinhos. (E) Rédia coletada de molusco infectado. ....	109
Figura 20 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para representantes da família Echinochasmidae, inferida através de 28S (1064 bp, modelo evolutivo GTR + G + I).. ....	111
Figura 21 – <i>Drepanocephalus</i> sp. Cercária emergida de <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corado com sulfato azul do Nilo.....	113
Figura 22 – <i>Echinostoma</i> sp. (A) Cercária emergida (fixada em formol) de <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Detalhe das membranas natatórias na cauda. ....	116
Figura 23 – Echinostomatidae gen. sp. (A) Cercária emergida de <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano corado com vermelho neutro. (C) Detalhe do colar cefálico com espinhos. (D) Rédia. (E) Metacercária encistada, recuperada de <i>B. straminea</i> . ....	120
Figura 24 – <i>Ribeiroia</i> sp. (A) Cercária emergida de <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada com vermelho neutro. (B) Detalhe da membrana pregueada na ventosa ventral (C) Rédia recuperada de molusco infectado. ....	124
Figura 25 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para representantes da família Echinostomatidae, inferida através de 28S (729 bp, modelo evolutivo GTR + G + I). ....	125
Figura 26 – <i>Philophthalmus</i> sp. nov. (A) Cercária emergida de <i>Aylacostoma tuberculatum</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Metacercária encistada em substrato sólido. (C) Rédia recuperada de <i>A. chloroticum</i> . (D) Espécime recuperado de <i>Gallus gallus domesticus</i> no dia 45 pós-infecção corado pelo carmim. (E) Ovo maturo. (F) Miracídio. ....	130
Figura 27 – Árvores filogenéticas obtidas pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para representantes da família Philophthalmidae, inferida através de 28S (903 bp, modelo evolutivo GTR + G) (A) e <i>cox1</i> (618 bp, modelo evolutivo HKY + G) (B).....	133

Figura 28 – Microphalloidea gen. sp. (A) Cercária emergida de <i>Aylacostoma chloroticum</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano corado pelo sulfato azul de Nilo. (C) Detalhe do estilete. (D) Cauda com tegumento liso. ....	136
Figura 29 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para representantes da subordem Xiphidiata inferida através de 28S (1186 bp, modelo evolutivo: GTR+G+I).. ....	137
Figura 30 – Lecithodendriidae gen. sp. 1. (A) Cercária emergida de <i>Aylacostoma tuberculatum</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada pelo vermelho neutro. (B) Corpo cercariano corado pelo vermelho neutro. (C) Esporocisto recuperado de molusco infectado. ....	140
Figura 31 – Lecithodendriidae gen. sp. 2 (A) Cercária emergida de <i>Aylacostoma tuberculatum</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada pelo sulfato azul de Nilo. (B) Corpo cercariano corado pelo vermelho neutro. (C) Detalhe da cauda com microespinhos. (D) Esporocisto recuperado de molusco infectado. ....	143
Figura 32 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para alguns membros da superfamília Microphalloidea, inferida através de 28S (987 bp, modelo evolutivo GTR + G + I).....	145
Figura 33 – Phaneropsolidae gen. sp. (A) Cercária emergida de <i>Aylacostoma chloroticum</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano com vermelho neutro. (C) Esporocisto recuperado de molusco infectado. (D) Metacercária encontrada em larva de Odonata.....	148
Figura 34 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para alguns membros da superfamília Microphalloidea, inferida através de 28S (1158 bp, modelo evolutivo: GTR + G + I).....	149
Figura 35 – Cryptogonimidae gen. sp. (A) Cercária emergida de <i>Aylacostoma tuberculatum</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano corado pelo vermelho neutro. (C) Rédia recuperada de molusco infectado. (D) Metacercária encistada recuperada experimentalmente de <i>Poecilia reticulata</i> , 25 dias pós-infecção. (E) Metacercária desencistada. (F) Detalhe da coroa de espinhos na ventosa oral. (G) Metacercária corada pelo carmim. ....	152
Figura 36 – <i>Neocladocystis</i> sp. (A) Cercária emergida de <i>Aylacostoma tuberculatum</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, fixada em formol. (B) Corpo cercariano corado pelo sulfato azul de Nilo. (C) Detalhe das membranas natatórias na cauda. ....	155

Figura 37 – <i>Pseudosellacotyla lutzi</i> . (A) Cercária emergida de <i>Aylacostoma tuberculatum</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada pelo vermelho neutro. (B) Corpo cercariano. (C) Rédia recuperada de molusco infectado. (D) Metacercária encistada na espinha de <i>Poecilia reticulata</i> após 15 de infecção. (E) Metacercária encistada. (F) Metacercária corada pelo carmim aceto-alúmem. (G) Adulto recuperado de <i>Hoplias malabaricus</i> naturalmente infectado da área de estudo. ....	159
Figura 38 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para espécies da família Cryptogonimidae, inferida através de 28S (750 bp, modelo evolutivo: GTR + G).....	160
Figura 39 – Cercária de <i>Centrocestus formosanus</i> emergida de <i>Melanoides tuberculata</i> coletado no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada pelo sulfato azul de Nilo. ....	163
Figura 40 – Cercária de Heterophyidae gen. sp. emergida de <i>Aylacostoma chloroticum</i> coletado no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. ....	163
Figura 41 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança de representantes da superfamília Opisthorchioidea, inferida através de 28S (832 bp, modelo evolutivo: GTR + G + I). ....	164
Figura 42 – <i>Choledocystus</i> sp. (A) Cercária emergida de Ancylineae gen. sp. coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano com sulfato azul do Nilo. (C) Detalhe da cauda. (D) Esporocistos recuperados de molusco infectado.....	167
Figura 43 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança de representantes da superfamília Plagiorchioidea, inferida através de 28S (957 bp, modelo evolutivo: GTR + G).....	169
Figura 44 – Notocotylidae gen. sp. (A) Cercária emergida de <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Metacercária encistada. (C) Rédia recuperada de molusco infectado.....	172
Figura 45 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança de representantes da superfamília Pronocephaloidea, inferida através de 28S (1156 bp, modelo evolutivo GTR + G + I). ....	174
Figura 46 – <i>Zygocotyle lunata</i> . (A) Cercária emergida de <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Metacercária encistada. (C) Rédia recuperada de molusco infectado. Parasito adulto obtido experimental em <i>Mus musculus</i> 30 dias pós-infecção. ....	177

Figura 47 – Aporocotylidae gen. sp. 1. (A) Cercária emergida de <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada pelo vermelho neutro. (B) Corpo cercariano corado com vermelho neutro. (C) Detalhe das furcas. ....	180
Figura 48 – Aporocotylidae gen. sp. 2. (A) Cercária emergida de <i>Aylacostoma tuberculatum</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada pelo sulfato azul de Nilo. (B) Corpo cercariano. (C) Detalhe das furcas coradas por vermelho neutro. (E) Esporocisto recuperado de molusco infectado. ....	183
Figura 49 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança de representantes da família Aporocotylidae, inferida através de 28S (1217 bp, modelo evolutivo: GTR + G + I). ....	184
Figura 50 – Schistosomatidae gen. sp. 1 (A) Cercária (fixada em formol) detectada em <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano. ....	187
Figura 51 – Schistosomatidae gen. sp. 2. (A) Cercária emergida de <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada pelo vermelho neutro. (B) Corpo cercariano. (C) Tronco caudal com microespinhos no tegumento. (D) Furca com membrana natatória. (E) Esporocistos recuperados de molusco infectado. ....	189
Figura 52 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança de representantes da família Schistosomatidae, inferida através de 28S (947 bp, modelo evolutivo GTR + G). ....	191
Figura 53 – Spirorchiidae gen. sp. (A) Cercária detectada em <i>Biomphalaria straminea</i> coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano com vermelho neutro. (C) Detalhe do tegumento com microespinhos na região anterior do corpo. (D) Furca com membrana natatória com espinhos. ....	194
Figura 54 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança de representantes da família Spirorchiidae, inferida através de 28S (939 bp, modelo evolutivo: GTR + G + I). ....	196
Figura 55 – Outros trematódeos recuperados de peixes no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corados pelo carmim. (A) <i>Apharyngostrigea</i> sp. (B) <i>Neocladocystis intestinalis</i> . (C) <i>Posthodiplostomum nanum</i> . (D) Crassiphialinae gen. sp. ....	198

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Trematódeos digenéticos encontrados em peixes da bacia do Rio São Francisco. ....	29
Tabela 2 – Lista de moluscos dulciaquícolas reportados na bacia do Rio São Francisco. ....	35
Tabela 3 – Primers utilizados para a amplificação e sequenciamento de genes ribossomais e mitocondriais dos parasitos encontrados no presente estudo. ....	55
Tabela 4 – Espécies de moluscos coletadas, número absoluto e relativo de exemplares infectados por larvas de trematódeos e número de espécies destes helmintos verificadas durante as atividades de campo realizados no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, entre julho de 2017 e agosto de 2019.....	61
Tabela 5 – Lista de outros hospedeiros procedentes do Rio São Francisco avaliados no presente estudo. ....	63
Tabela 6 – Lista dos 31 trematódeos detectados durante as coletadas realizadas no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, entre os meses de julho de 2017 e agosto de 2019, considerando os respectivos hospedeiros naturais e experimentais. ....	64
Tabela 7 – Comparação morfométrica da larva emergida de <i>B. straminea</i> e de <i>Clinostomum</i> spp. reportados por diferentes autores. ....	71
Tabela 8 – Comparação morfométrica da metacercária de <i>Clinostomum heluans</i> encontrado em <i>Australoheros</i> sp. e de <i>Clinostomum</i> spp. reportados por diferentes autores. ....	72
Tabela 9 – Dados morfométricos de metacercárias de <i>Austrodiplostomum compactum</i> obtidas naturalmente em no presente estudo e de outros isolados da mesma espécie e de <i>A. mordax</i> reportados por diferentes autores.....	77
Tabela 10 – Dados morfométricos de cercária de <i>Hysteromorpha</i> sp. no presente estudo e outras espécies do gênero reportados por diferentes autores.....	82
Tabela 11 – Dados morfométricos da cercária de <i>Tylodelphys</i> sp. obtida no presente estudo e de outras espécies do gênero reportados por diferentes autores no continente americano, incluindo os dados de <i>Austrodiplostomum compactum</i> . ....	87
Tabela 12 – Dados morfométricos de metacercária de <i>Tylodelphys</i> sp. obtida experimentalmente no presente estudo e de metacercárias do mesmo gênero encontradas na cavidade visceral de peixes no continente americano. ....	88



Tabela 13 – Dados morfométricos de cercária e metacercária de <i>Cotylurus</i> sp. obtidos no presente estudo e de larvas semelhantes descritas por outros autores no continente americano. ....	93
Tabela 14 – Dados morfométricos da cercária e metacercária de <i>Parastrigea</i> sp. do presente estudo e de Furcocercaria XX reportado na Argentina. ....	98
Tabela 15 – Dados morfométricos da cercária de Echinochasmidae gen. sp. e outras espécies da mesma família descritas por diferentes autores. ....	103
Tabela 16 – Dados morfométricos das cercária de <i>Stephanoprora</i> spp. encontrados no presente estudo e de outras espécies do gênero relatadas na Argentina. ....	110
Tabela 17 – Dados morfométricos da cercária de <i>Drepanocephalus</i> sp. e de outras espécies do gênero reportadas no Brasil. ....	113
Tabela 18 – Dados morfométricos das cercária de <i>Echinostoma</i> sp. encontrado no presente estudo e de outras espécies do gênero relatados no Brasil. ....	117
Tabela 19 – Comparação morfométricas da cercária de Echinostomatidae gen. sp. encontrado no presente estudo com semelhantes relatadas na Brasil. ....	121
Tabela 20 – Dados morfométricos da cercária de <i>Philophthalmus</i> sp. nov. encontrada no presente estudo e de outras espécies do gênero reportadas em ambiente dulciaquícolas no continente americano. ....	131
Tabela 21 – Comparação morfométrica de <i>Philophthalmus</i> spp. reportados no continente americano por diferentes autores. ....	132
Tabela 22 – Comparação de dados morfométricos de Lecithodendriidae spp. encontrados no presente estudo com larvas semelhantes reportados por outros autores. ....	144
Tabela 23 – Comparação de dados morfométricos das cercárias de cryptogonimídeos (com ocelos) encontrados no presente estudo com a detectada em <i>Aylacostoma chloroticum</i> na Argentina. ....	156
Tabela 24 – Comparação morfométrica das larvas de <i>Choledocystus</i> sp. e <i>Glypthelmins</i> spp. reportados nos Estados Unidos. ....	168
Tabela 25 – Comparação morfométrica dos estágios larvais de Notocotylidae gen. sp. e outras espécies da mesma família reportadas por diferentes autores. ....	173
Tabela 26 – Comparação morfométrica das larvas de esquistossomatídeos encontrados no presente estudo com as reportados por outros autores no continente americano. ....	190
Tabela 27 – Comparação morfométrica das larvas da família Spirorchiidae encontradas no presente estudo com dados disponíveis para outras espécies registradas no continente americano. ....	195

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

18S rDNA: Subunidade menor do DNA ribossomal

28S rDNA: Subunidade maior do DNA ribossomal

A: Adulto

Aff: Affinis

Cf: Conferre

C: Comprimento

*coxI*: Subunidade I da enzima citocromo oxidase

Col: Coletados

d: diâmetro

D: Distância

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

DPI: Dias pós-infecção

Inf: Infectados

IGS: Intergenic spacer

ITS: *Internal transcribed spacer*

L: Largura

M: Metacercária

*nadI*: Subunidade da enzima nicotinamida desidrogenase

N: Número

PCR: *Polymerase chain reaction*

RSF: Rio São Francisco

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	Estudo de trematódeos na bacia do Rio São Francisco .....	26
1.1.1	O Rio São Francisco .....	26
1.1.2	Estudo de trematódeos no RSF .....	27
1.1.3	Moluscos como hospedeiros intermediários e digenéticos associados.....	33
1.2	Abordagem taxonômica integrativa na identificação de trematódeos digeneicos .....	37
2	JUSTIFICATIVA .....	41
3	OBJETIVOS.....	42
	Objetivo geral.....	42
	Objetivos específicos.....	42
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	43
4.1	Área de estudo .....	43
4.2	Coletas de moluscos.....	46
4.3	Avaliação da infecção dos moluscos por larvas de trematódeos.....	46
4.4	Identificação morfológica dos moluscos.....	47
4.5	Pesquisa de formas evolutivas em outros hospedeiros .....	47
4.6	Estudos experimentais .....	48
4.6.1	Obtenção de metacercárias.....	48
4.6.2	Infecção experimental de hospedeiros definitivos .....	49
4.6.3	Exame parasitológico.....	50
4.6.4	Recuperação de parasitos adultos.....	50
4.6.5	Comitê de ética.....	51
4.7	Estudo morfológico dos estágios evolutivos.....	51
4.8	Caracterização molecular .....	52
4.8.1	Fixação de amostras, extração e quantificação de DNA .....	52
4.8.2	Amplificação de DNA .....	53
4.8.3	Purificação dos produtos de PCR.....	54
4.8.4	Sequenciamento de DNA.....	56
4.8.5	Edição de sequências e análise filogenética.....	56
5	RESULTADOS .....	58
5.1	Coletas de moluscos e infecção por larvas de trematódeos .....	58

5.2	Outros hospedeiros infectados por trematódeos.....	62
5.3	Espécies encontradas em moluscos .....	62
5.3.1	Superfília Clinostomatoidea Lühe, 1901.....	67
5.3.1.1	Família Clinostomidae Lühe, 1901 .....	67
5.3.1.1.1	<i>Clinostomum heluans</i> Braun, 1901.....	67
5.3.2	Superfamília Diplostomoidea Poirier, 1886.....	74
5.3.2.1	Família Diplostomidae Poirier, 1886.....	74
5.3.2.1.1	<i>Austrodiplostomum compactum</i> (Lutz, 1928) .....	74
5.3.2.1.2	<i>Hysteromorpha</i> sp.....	79
5.3.2.1.3	<i>Tylodelphys</i> sp. ....	83
5.3.2.2	Família Strigeidae Railliet, 1919.....	90
5.3.2.2.1	<i>Cotylurus</i> sp.....	90
5.3.2.2.2	<i>Parastrigea</i> sp. ....	95
5.3.3	Superfamília Echinostomatoidea Looss, 1899.....	100
5.3.3.1	Família Echinochasmidae Odhner, 1910 .....	100
5.3.3.1.1	Echinochasmidae gen. sp. ....	100
5.3.3.1.2	<i>Stephanoprora</i> sp. 1 .....	104
5.3.3.1.3	<i>Stephanoprora</i> sp. 2.....	107
5.3.3.2	Família Echinostomatidae Looss, 1899 .....	112
5.3.3.2.1	<i>Drepanocephalus</i> sp. ....	112
5.3.3.2.2	<i>Echinostoma</i> sp.....	114
5.3.3.2.3	Echinostomatidae gen. sp.....	118
5.3.3.2.4	<i>Ribeiroia</i> sp. ....	122
5.3.3.3	Família Philophthalmidae Looss, 1899 .....	126
5.3.3.3.1	<i>Philophthalmus</i> sp. nov.....	126
5.3.4	Superfamília Microphalloidea Ward, 1901.....	134
5.3.4.1	Microphalloidea gen. sp.....	134
5.3.4.2	Família Lecithodendriidae Lühe, 1901 .....	138
5.3.4.2.1	Lecithodendriidae gen. sp. 1 .....	138
5.3.4.2.2	Lecithodendriidae gen. sp. 2 .....	141
5.3.4.3	Família Phaneropsolidae Mehra, 1935 .....	146
5.3.4.3.1	Phaneropsolidae gen. sp.....	146
5.3.5	Superfamília Opisthorchioidea Looss, 1899.....	150
5.3.5.1	Família Cryptogonimidae Ward, 1917 .....	150

5.3.5.1.1	Cryptogonimidae gen. sp. ....	150
5.3.5.1.2	<i>Neocladocystis</i> sp.....	153
5.3.5.1.3	<i>Pseudosellacotyla lutzii</i> .....	157
5.3.5.2	Família Heterophyidae Leiper, 1909 .....	161
5.3.5.2.1	<i>Centrocestus formosanus</i> (Nishigori, 1924) .....	161
5.3.5.2.2	Heterophyidae gen. sp.....	162
5.3.6	Superfamília Plagiorchioidea Lühe, 1901.....	165
5.3.6.1	Família Plagiorchiidae Lühe, 1901.....	165
5.3.6.1.1	<i>Choledocystus</i> sp. ....	165
5.3.7	Superfamília Pronocephaloidea Looss, 1899.....	170
5.3.7.1	Família Notocotylidae Lühe, 1909 .....	170
5.3.7.1.1	Notocotylidae gen. sp.....	170
5.3.8	Superfamília Paramphistomoidea Fiscoeder, 1901 .....	175
5.3.8.1	Família Zygotylidae Ward, 1917.....	175
5.3.8.1.1	<i>Zygotyle lunata</i> .....	175
5.3.9	Superfamília Schistosomatoidea Stiles & Hassall, 1898 .....	178
5.3.9.1	Família Aporocotylidae Odhner, 1912 .....	178
5.3.9.1.1	Aporocotylidae gen. sp. 1.....	178
5.3.9.1.2	Aporocotylidae gen. sp. 2.....	181
5.3.9.2	Família Schistosomatidae Stiles & Hassall, 1898 .....	185
5.3.9.2.1	Schistosomatidae gen. sp. 1.....	185
5.3.9.2.2	Schistosomatidae gen. sp. 2.....	188
5.3.9.3	Família Spirorchiidae Stunkard, 1921 .....	192
5.3.9.3.1	Spirorchiidae gen. sp.....	192
5.4	Trematódeos recuperados em peixes, sem moluscos transmissores identificados .....	197
6	DISCUSSÃO.....	199
7	CONCLUSÕES.....	226
8	REFERÊNCIAS .....	228
	APÊNDICE 1 .....	263
	APÊNDICE 2 .....	265
	APÊNDICE 3 .....	267
	ANEXO.....	270

## 1 INTRODUÇÃO

No filo Platyhelminthes Gegenbaur, 1859, o subfilo Neodermata Ehlers, 1985 é um táxon monofilético representado por organismos que apresentam uma epiderme especializada (neoderme) à vida parasitária. Atualmente está constituído por três classes: Cestoda Rudolphi, 1808, Monogenea van Beneden, 1858 e Trematoda Rudolphi, 1808 (CRIBB et al., 2003; BISEROVA, 2015). Dentro desta última, a subclasse Digenea Carus, 1863 representa um grupo diversificado entre os platelmintos, com 2.500 gêneros nominais e 18.000 espécies descritas parasitando todas as classes de vertebrados (WHITFIELD, 2009; KOSTADINOVA; PÉREZ-DEL-OLMO, 2014).

Os trematódeos digeneicos apresentam ciclos biológicos complexos, envolvendo a alternância de gerações. A fase de reprodução sexuada ocorre em hospedeiro definitivo, no qual é encontrado o estágio adulto, enquanto a fase de geração assexuada corresponde aos estágios larvais localizados no primeiro hospedeiro intermediário, usualmente um molusco e ocasionalmente um anelídeo, nos quais ocorre a formação de larvas denominadas cercárias (MADHAVI; BRAY, 2018). Na maior parte dos casos, estas larvas necessitam atingir um novo hospedeiro intermediário (invertebrado ou vertebrado) para o desenvolvimento da forma infectante denominada metacercária. Quando o segundo hospedeiro intermediário for predado pelo hospedeiro definitivo, o parasito atingirá a forma adulta (SCHELL, 1970; POULIN; CRIBB, 2002). Existem ainda espécies em que (i) as cercárias infectam ativamente o hospedeiro definitivo por penetração cutânea, (ii) há o encistamento na água ou vegetação que servirá de alimento ao hospedeiro definitivo, (iii) metacercárias são formadas no mesmo molusco que age como primeiro hospedeiro intermediário, (iv) cercárias são ingeridas pelo hospedeiro definitivo (GALAKTIONOV; DOBROVOLSKIJ, 2003; CRIBB et al., 2003).

Helminthos parasitos como os trematódeos digeneicos são componentes integrais de todos os ecossistemas (MARCOGLIESE, 2005). Eles são unidades biológicas que possuem valiosas informações que permitem a aplicação de adequadas medidas de controle, não só de doenças de importância médica, mas também para a proteção e conservação de animais domésticos e silvestres (MARCOGLIESE, 2004). Ao longo dos anos, pesquisas com diferentes abordagens têm contribuído no conhecimento de trematódeos, permitindo ampliar a compreensão de aspectos de biologia, biodiversidade, a interação hospedeiro-parasito, assim como de aspectos evolutivos.

O Brasil, um país de dimensão continental, é considerado um dos mais diversos biologicamente, com seis biomas terrestres e três ecossistemas marinhos, contando com uma rica fauna (BRASIL, 2010). O esforço de diversos parasitologistas em conhecer a diversidade de trematódeos digeneicos que ocorrem no território brasileiro é refletido na quantidade de espécies já reportadas no país, atualmente composta por mais de 750 espécies e aproximadamente 20% delas foram encontradas em organismos vertebrados de ambientes dulciaquícolas (KOHN et al., 2007; FERNANDES; KOHN, 2014; FERNANDES et al., 2015; COHEN et al., 2020). Estudos malacológicos realizados principalmente em lagoas e riachos têm sido realizados ao longo de mais de um século no Brasil, estando geralmente associados à epidemiologia da esquistossomose mansoni (PINTO; MELO, 2013a, c). Tais estudos revelaram a ocorrência de uma diversidade de formas larvais em moluscos do país, a maior parte ainda não associada aos respectivos parasitos adultos (PINTO; MELO, 2013b). Em se tratando de rios, as pesquisas malacológicas são escassas, destacando o trabalho realizado por Lutz (1924), avaliando a infecção de moluscos do rio das Velhas, no estado de Minas Gerais. Mais recentemente, Onaca et al. (2020) detectaram com o auxílio da biologia molecular a transmissão de três espécies de trematódeos no rio Paraná (Mato Grosso), uma delas com potencial zoonótico (*Philophthalmus* sp.).

Frente a isso, tornam-se necessários estudos que visem detectar os moluscos que ajudam na manutenção dos ciclos biológicos de trematódeos digeneicos em diversos ecossistemas, incluindo a fauna ocorrente nos grandes rios brasileiros. Adicionalmente, a implementação do uso de ferramentas moleculares no estudo destes parasitos poderia ajudar a explorar melhor a diversidade e ciclos biológicos destes parasitos que ocorrem em ambientes fluviais e que são ainda pouco conhecidos em nosso meio.

## **1.1 Estudo de trematódeos na bacia do Rio São Francisco**

### **1.1.1 O Rio São Francisco**

A bacia do Rio São Francisco constitui a terceira maior bacia hidrográfica do Brasil (ANA/GEF/PNUMA/OEA, 2004) e apresenta uma extensão de 2.863 km e possui uma área de drenagem de 639.219 km<sup>2</sup> (ROSA, 2019). O Rio São Francisco (RSF) ocupa

aproximadamente 8% do território nacional e é conhecido como o rio da Integração Nacional por percorrer 507 municípios de sete Unidades da Federação: Minas Gerais, Bahia, o Distrito Federal, Goiás, Pernambuco, Alagoas e Sergipe (CBHSF, 2016). Caracteriza-se por albergar uma rica diversidade de flora e fauna em virtude da extensa área abarcada, atravessando três biomas (Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica) (ROSA, 2019). Aproximadamente 19 milhões de pessoas habitam esta bacia (CBHSF, 2016), utilizando os recursos hídricos de diferentes formas: abastecimento, irrigação, geração de energia, navegação, saneamento, pesca e aquicultura, assim como atividades turísticas e de lazer (CBHSF, 2016; CODEVASF, 2016).

O RSF apresenta uma ampla riqueza de ambientes, o que lhe confere uma abundante fauna silvestre, destacando-se a diversidade de aves (135 espécies) (SCHUNCK et al., 2012) e peixes (304 espécies) (BARBOSA et al., 2017). Do ponto de vista parasitológico, os estudos envolvendo o inventário da fauna helmintológica de vertebrados neste rio são focados maioritariamente em peixes devido aos impactos na piscicultura e ao encontro de algumas espécies com potencial zoonótico (BRASIL-SATO, 2003). Com relação a este último aspecto, esses estudos apresentam uma grande importância por causa do consumo de peixes pela população. Entre as espécies mais representativas da culinária das populações ribeirinhas do RSF, encontram-se: curimatã (*Prochilodus* spp.), dourado (*Salminus franciscanus*), pintado ou surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*), matrinxãs (*Brycon* spp.), mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*), mandi-açu (*Duopalatinus emarginatus*), pirá (*Conrhynechus conirostris*), piaus (*Leporinus* spp.), pacamão (*Lophiosilurus alexandri*), traíra (*Hoplias* spp.), corvina (*Pachyurus* spp.) e piranha (*Pygocentrus piraya*) (BARBOSA; SOARES, 2009).

### 1.1.2 Estudo de trematódeos no RSF

Estudos sobre a fauna de helmintos parasitos de peixes revelaram que, até o momento, 27 trematódeos digenéticos (estágio de metacercária ou adulto) foram reportados em 23 espécies de peixes da bacia do RSF (Tabela 1). A maioria quase que absoluta destes registros foram realizados em peixes coletados em localidades do estado de Minas Gerais. Entre as formas adultas encontram-se representantes de onze famílias, 22 gêneros e 16 espécies. Já os relatos do encontro de metacercárias não são infrequentes, sendo relatados membros das famílias Clinostomidae Lühe, 1901, Diplostomidae Poirier,



1886 e Echinostomatidae Looss, 1899, destacando as duas primeiras por apresentarem importância na aquicultura.

Os clinostomídeos encontrados pertencem aos gêneros *Clinostomum* Leidy, 1856 e *Ithyoclinostomum* Witenberg, 1925. Sabe-se que as metacercárias de *Clinostomum* spp. podem se encistar na superfície corporal, órgãos viscerais ou na musculatura do hospedeiro (WANG et al., 2017), e comumente é referida pelos aquaculturistas e parasitologistas como o causante da doença dos pontos amarelos (ROSSER et al., 2018). Adicionalmente, *Clinostomum complanatum* Rudolphi, 1814 é considerada zoonótica, ocasionando casos de laringite em países como Coréia (PARK et al., 2009) e Japão (HARA et al., 2014) devido à ingestão de peixe cru. No caso dos diplostomídeos, os representantes dos gêneros *Austrodiplostomum* Szidat & Nani, 1951 e *Tylodelphys* Diesing, 1850 já relatados no RSF são considerados agentes etiológicos de diplostomose ocular em peixes de diferentes partes do mundo, ocasionado deficiência visual ou cegueira, inclusive a morte (ROSSER et al., 2016; BLASCO-COSTA; LOCKE, 2017). Em se tratando da família Echinostomatidae, Vasconcelos et al. (2013) reportaram com auxílio de técnicas moleculares a presença da metacercária de uma representante nas brânquias do lambari (*Astyanax* aff. *bimaculatus*) no baixo São Francisco. Ressalta-se que vinte equinostomatídeos possuem potencial zoonótico, e a maioria de casos têm sido reportados no continente asiático pelo consumo de moluscos e peixe cru contendo a forma larval (CHAI, 2009).

É inegável o aporte dos estudos ictioparasitológicos para conhecimento da diversidade de trematódeos digeneicos no RSF. Ainda assim, esta poderia ser complementada através da exploração de outros organismos. Como exemplo, apesar de possuir uma rica avifauna, apenas existe o relato de biguás, *Nannopterum brasilianus* (Gmelin, 1789), atuando como hospedeiro definitivo natural de *Austrodiplostomum compactum* Szidat & Nani, 1954 (MONTEIRO et al., 2016). Em se tratando dos moluscos, primeiros hospedeiros intermediários, os estudos com enfoque parasitológico são raros no RSF. Estes podem fornecer informações sobre os vetores de trematódeos com importância médico-veterinária além de conhecer aspectos dos ciclos biológicos deste grupo de parasitos neste ambiente.

Tabela 1 – Trematódeos digenéticos encontrados em peixes da bacia do Rio São Francisco. A: adulto; M: metacercária; MG: Minas Gerais; SE: Sergipe.

<b>Trematódeos</b>	<b>Estágio evolutivo</b>	<b>Hospedeiros</b>	<b>Sítio de infecção</b>	<b>Estado</b>	<b>Referências</b>
<b>Allocreadiidae</b>					
<i>Auriculostoma platense</i>	A	<i>Pimelodus pohli</i>	Intestino	MG	SABAS & BRASIL-SATO, 2014
<i>Creptotrema creptotrema</i>	A	<i>Conorhynchos conirostris</i>	Intestino	MG	BRASIL-SATO; SANTOS, 2005
		<i>Pimelodus maculatus</i>	Intestino		BRASIL-SATO; PAVANELLI, 2004
		<i>Tetragonopterus chalceus</i>	Intestino e ceco	MG	ALBURQUERQUE et al., 2016
<i>Crepidostomum platense</i>	A	<i>Pimelodus maculatus</i>	Intestino		BRASIL-SATO; PAVANELLI, 2004
<b>Aporocotylidae</b>					
<i>Plehnella coelomica</i>	A	<i>Pimelodus maculatus</i>	Cavidade celomática	MG	BRASIL-SATO; PAVANELLI, 2004
<b>Bucephalidae</b>					
<i>Bellumcorpus major</i>	A	<i>Salminus brasiliensis</i>	Vesícula biliar	MG	BRASIL-SATO, 2002
<b>Callodistomidae</b>					
<i>Prosthenthystera obesa</i>	A	<i>Leporinus reinhardi</i>	Vesícula biliar	MG	MARTINS et al., 2012
		<i>Pimelodus pohli</i>		MG	
		<i>Pimelodus maculatus</i>		MG	
		<i>Pseudoplatystoma corriscans</i>		MG	
		<i>Salminus brasiliensis</i>		MG	BRASIL-SATO, 2002

Tabela 1 – Continuação...

<b>Trematódeos</b>	<b>Estágio evolutivo</b>	<b>Hospedeiros</b>	<b>Sítio de infecção</b>	<b>Estado</b>	<b>Referências</b>
<b>Cladorchiidae</b>					
<i>Dadaytrema oxycephala</i>	A	<i>Myleus micans</i>	Intestino	MG	BRASIL-SATO; SANTOS, 2003
<i>Dadayius</i> sp.	A	<i>Metynnis lippincottianus</i>	Intestino		ALMEIDA-BERTO et al., 2018
<i>Microrchis</i> sp.	A	<i>Trachelyopterus galeatus</i>	Intestino	MG	BRASIL-SATO, 2003
<i>Travassosinia dilatada</i>		<i>Myleus micans</i>	Intestino	MG	BRASIL-SATO; SANTOS, 2003
<b>Clinostomidae</b>					
<i>Clinostomum</i> sp.	M	<i>Pimelodus maculatus</i>	Brânquias	MG	BRASIL-SATO; PAVANELLI, 2004
<i>Ithyoclinostomum</i> sp.	M	<i>Conorhynchos conirostris</i>		MG	BRASIL-SATO; SANTOS, 2005
		<i>Hoplias intermedius</i>	Cavidade celômica	MG	COSTA et al., 2015
		<i>Hoplias malabaricus</i>	estômago	e	
<b>Cryptogonimidae</b>					
<i>Acanthostomum gnerii</i>	A	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	Intestino	MG	CORRÊA; BRASIL-SATO, 2008
<i>Acanthostomum</i> sp.	A	<i>Pseudoplatystoma carruscans</i>	Intestino	MG	CORRÊA; BRASIL-SATO, 2008
<i>Neocladocystis intestinalis</i>	A	<i>Salminus brasiliensis</i>	Intestino	MG	BRASIL-SATO, 2002
<i>Pseudosellacotyla lutzi</i>	A	<i>Hoplias intermedius</i>	Ceco pilórico	MG	COSTA et al., 2015
<i>Palaeocryptogonimus claviformis</i>	A	<i>Conorhynchos conirostris</i>	Intestino	MG	BRASIL-SATO; SANTOS, 2005
		<i>Leporinus obtusidens</i>		MG	
		<i>Leporinus reinhardti</i>		MG	
		<i>Moenhkhaysia costae</i>		MG	
		<i>Pachyrus squanmipennis</i>		MG	
		<i>Pimelodus maculatus</i>		MG	
		<i>Pygocentrus piraya</i>		MG	

Tabela 1 – Continuação...

<b>Trematódeos</b>	<b>Estágio evolutivo</b>	<b>Hospedeiros</b>	<b>Sítio de infecção</b>	<b>Estado</b>	<b>Referências</b>
		<i>Trachelyopterus galeatus</i>		MG	
<b>Derogonidae</b>					
<i>Thometrema overstreeti</i>	A	<i>Pimelodus maculatus</i>	Estômago	MG	BRASIL-SATO, 2003
<b>Diplostomidae</b>					
Diplostomidae sp. (Tipo Neascus)	M	<i>Astyanax aff. bimaculatus</i>	Bexiga natatória	MG	VASCONCELOS et al., 2013
<i>Austrodiplostomum</i> sp.	M	<i>Conorhynchos conirostris</i>	Brânquias e olhos	MG	BRASIL-SATO & SANTOS, 2005
		<i>Hoplias intermedius</i>	Olhos	MG	COSTA et al., 2015
		<i>Hoplias malabaricus</i>	Olhos e cavidade cranial	MG	CORRÊA et al., 2014
<i>Austrodiplostomum campactum</i>		<i>Cichla kelberi</i>		MG	SANTOS-CLAPP & BRASIL-SATO, 2014
		<i>Pimelodus pohli</i>	Olhos	MG	SABAS & BRASIL-SATO, 2014
		<i>Astyanax bimaculatus</i>		MG	MONTEIRO et al., 2016
		<i>Bryconops affinis</i>		MG	
		<i>Cephalosilurus fowleri</i>		MG	
		<i>Curimatella lepidura</i>		MG	
		<i>Duopalatinus emarginatus</i>		MG	
		<i>Leporinus obtusidens</i>		MG	
		<i>Leporinus reinhardti</i>		MG	
		<i>Moenhkhaysia costae</i>		MG	
		<i>Pachyrus squanmipennis</i>		MG	

Tabela 1 – Continuação...

<b>Trematódeos</b>	<b>Estágio evolutivo</b>	<b>Hospedeiros</b>	<b>Sítio de infecção</b>	<b>Estado</b>	<b>Referências</b>
<i>Tylodelphys</i> sp.	M	<i>Pimelodus maculatus</i> <i>Pygocentrus piraya</i> <i>Trachelyopterus galeatus</i> <i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	Intestino e bexiga natatória	MG MG MG MG	CORRÊA; BRASIL-SATO, 2008
<b>Echinostomatidae</b> Echinostomatidae sp.	M	<i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i>	Brânquias	SE	VASCONCELOS et al., 2013
<b>Fellodistomidae</b> <i>Kalipharynx</i> sp.	A	<i>Pimelodus pohli</i>	Ceco	MG	SABAS; BRASIL-SATO, 2014
<b>Gorgoderidae</b> <i>Phyllodistomum spatula</i>	A	<i>Hoplias intermedius</i>	Bexiga urinária e cavidade celômica	MG	COSTA et al., 2015
<b>Haploporidae</b> <i>Saccocoelioides nanii</i>	A	<i>Prochilodus argenteus</i>	Intestino	MG	MONTEIRO; BRASIL-SATO, 2010
<b>Opisthorchidae</b> <i>Witenbergia witenbergi</i>	A	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	Intestino	MG	CORRÊA; BRASIL-SATO, 2008

### 1.1.3 Moluscos como hospedeiros intermediários e digenéticos associados

Uma diversidade composta por 37 espécies de moluscos dulciaquícolas (24 bivalves e 13 gastrópodes) já foi registrada na bacia do RSF (Tabela 2). Apesar desta considerável malacofauna, estudos visando avaliar a participação destes moluscos na transmissão de trematódeos são escassos. Entre eles, encontram-se trabalhos que visaram detectar os moluscos transmissores de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em municípios situados próximos ao RSF, nos estados de Bahia (BARRETTO et al., 1981) e Minas Gerais (LIMA E COSTA et al., 2016). Em um outro estudo, Barbosa et al. (2011) reportaram *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) como hospedeiro intermediário de *Zygocotyle lunata* (Diesing, 1836), parasito intestinal de aves e mamíferos, em lagoas adjacentes ao RSF no município de Iguatama, região centro-oeste de Minas Gerais. Recentemente, Melo (2018) detectou em Nossa Senhora de Lourdes, estado de Sergipe, a transmissão de larvas do tipo pleurolofocerca e xifidiocercária por *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) e *Vivax Cercaria* por *B. straminea*. No entanto, dados morfométricos desses parasitos não foram mencionados na dissertação realizada por este autor.

Entre os moluscos já relatados no RSF e que apresentam potencial na transmissão de trematódeos, ressalta-se o gastrópode *B. straminea*, que além de ser o um dos três planorbídeos vetores de *S. mansoni* no Brasil, é reconhecido como hospedeiro intermediário de representantes das famílias Diplostomidae, Echinostomatidae, Notocotylidae, Spirorchiidae, entre outras (PINTO et al., 2013b; PINTO et al., 2015b, PINTO et al., 2016; ASSIS et al., 2019; LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019; CICCHETO et al., 2021). Um outro grupo de moluscos com potencial de atuarem na transmissão de trematódeos no RSF são as espécies do gênero *Aylacostoma* Spix, 1827. Como exemplo, *Aylacostoma chloroticum* Hylton Scott, 1954 vem sendo estudado desde 2008 no território argentino com a implementação de trabalhos experimentais em modelos biológicos, onde tem sido relatada a sua participação no ciclo de vida de dois criptogonómídeos, *Neocladocystis intestinalis* (QUINTANA; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2016) e *Pseudosellacotyla lutzi* (QUINTANA; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2014), e de duas novas espécies, *Stephanoprora aylacostoma* (OSTROWSKI DE NÚÑEZ; QUINTANA, 2008) e *Heterophyes yacyretana* (OSTROWSKI DE NÚÑEZ et al., 2020). Já no Brasil, estudos realizados no rio Paraná, estado de Mato Grosso do Sul, identificaram através do uso de ferramentas moleculares a infecção de *A. chloroticum* por

formas larvais de *Paralecithodendrium* sp., *P. lutzi* e *Philophthalmus* sp. (ONACA et al, 2020). Adicionalmente, sabe-se sobre a presença do molusco invasor *M. tuberculata* nas águas do RSF (LIMA et al., 2013), conhecido por ser responsável pela transmissão dos trematódeos zoonóticos *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (PINTO; MELO, 2010a), *Haplorchis pumilio* (Looss, 1896) (LOPES et al., 2020) e *Philophthalmus gralli* Mathis & Leger, 1910 (PINTO; MELO, 2010b) no território brasileiro. Estes dados reforçam que estudos malacológicos associados com abordagens parasitológicas são essenciais para ampliar o conhecimento da interação entre moluscos e trematódeos em rios brasileiros.

Tabela 2 – Lista de moluscos dulciaquícolas reportados na bacia do Rio São Francisco.

<b>Moluscos</b>	<b>Origem</b>	<b>Referências</b>
<b>CLASSE BIVALVIA</b>		
<b>Cyrenidae</b>		
<i>Corbicula fluminea</i>	Invasor	PEREIRA et al., 2012
<i>Corbicula largillierti</i>	Invasor	PEREIRA et al., 2012
<b>Hyriidae</b>		
<i>Castalia ambigua</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<i>Diplodon ellipticus</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<i>Diplodon funebris</i>	Nativo	PEREIRA et al., 2012
<i>Diplodon rhombeus</i>	Nativo	PEREIRA et al., 2012
<i>Diplodon rotundus</i>	Nativo	PEREIRA et al., 2012
<i>Rhipidodonta rhombea</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<i>Rhipidodonta suavidica</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<b>Mycetopodidae</b>		
<i>Anodontites moricandi</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<i>Anodontites obtusus</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<i>Anodontites patagonicus</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<i>Anodontites soleniformis</i>	Nativo	PEREIRA et al., 2012
<i>Anodontites tenebricosus</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<i>Anodontites trapesialis</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<i>Anodontites trapezeus</i>	Nativo	PEREIRA et al., 2012
<i>Fossula fossiculifera</i>	Nativo	PEREIRA et al., 2012
<i>Mycetopoda siliquosa</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<i>Monocondylaea paraguayana</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<i>Monocondylaea franciscana</i>	Nativo	PEREIRA et al., 2012
<b>Mytilidae</b>		
<i>Limnoperna fortunei</i>	Invasor	BARBOSA et al., 2016
<b>Sphaeriidae</b>		
<i>Eupera bahiensis</i>	Nativo	PEREIRA et al., 2012
<i>Pisidium pulchellum</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<i>Pisidium punctiferum</i>	Nativo	PEREIRA et al., 2012
<b>CLASSE GASTROPODA</b>		
<b>Ampullariidae</b>		
<i>Asolene meta</i>	Nativo	MELO, 2018
<i>Pomacea lineata</i>	Nativo	MELO, 2018
<b>Thiaridae</b>		
<i>Aylacostoma brasiliensis</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<i>Aylacostoma tuberculatum</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<i>Aylacostoma tenuilabris</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<i>Melanoides tuberculata</i>	Invasor	LIMA et al., 2013



Tabela 2 – Continuação...

<b>Moluscos</b>	<b>Origem</b>	<b>Referências</b>
<b>Planorbidae</b>		
<i>Biomphalaria straminea</i>	Nativo	MELO, 2018
<i>Drepanotrema cimex</i>	Nativo	MELO, 2018
<i>Drepanotrema depressissimum</i>	Nativo	MELO, 2018
<i>Drepanotrema lucidum</i>	Nativo	MELO, 2018
<i>Ferrissia fragilis</i>	Nativo	LACERDA et al, 2015
<b>Pomatiopsidae</b>		
<i>Idiopyrgus rudolphi</i>	Nativo	SIMONE, 2006
<b>Physidae</b>		
<i>Stenophysa acuta</i>	Invasor	MELO, 2018

## **1.2 Abordagem taxonômica integrativa na identificação de trematódeos digeneicos**

A taxonomia é a ciência responsável pela classificação e nomeação dos seres vivos, permitindo conhecer a biodiversidade existente. Taxonomistas têm descrito milhares de espécies a cada ano e os números têm incrementado em diversos grupos de organismos devido à implementação de avanços tecnológicos (PADIAL et al., 2010). Além disso, ela ainda encontra-se evoluindo através da interação sinérgica com outras áreas como a ecologia, genética e estatística (PANTE, et al., 2015). Como resultado, isto tem levado ao surgimento da taxonomia integrativa, nome dado à abordagem que tem a finalidade de descrever e delimitar espécies a partir de múltiplas perspectivas que se complementam (DAYRAT, 2005).

No caso dos trematódeos digeneicos, a identificação taxonômica até o nível de espécie, de forma tradicional, é realizada em base à morfologia dos estágios adultos. Porém, a obtenção destas formas parasitárias é dificultada pelo acesso aos hospedeiros, principalmente em espécies de vertebrados da fauna silvestre. Outros estágios evolutivos, como cercárias e metacercárias, também são alvos de estudo, que apesar de não garantir na maior parte dos casos uma identificação específica, podem dar uma noção em categorias taxonômicas superiores. A primeira, apresenta características morfológicas abruptamente diferentes do estágio adulto. Mesmo assim, a contribuição de diversos pesquisadores tem permitido a distinção de tipos cercarianos que caracterizam determinadas famílias ou superfamílias de trematódeos (DAWES, 1946; COMBES et al., 1980; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 1992). Em se tratando de metacercárias, estes estágios infectantes podem apresentar, em alguns casos, características morfológicas próximas à fase adulta, o que pode auxiliar na categorização taxonômica (gênero ou família) (CAFFARA et al., 2017; GALAKTIONOV; BLASCO-COSTA, 2018; OLSON; PIERCE, 1997). Apesar disso, frequentemente existem limitações no estudo de metacercárias, devido à fatores como o tamanho e fragilidade do espécime e o nível de desenvolvimento em que se encontra (SCHOLZ et al., 2000).

Diante das dificuldades inerentes ao estudo de formas larvais deste grupo de parasitos, a realização de trabalhos experimentais em modelos biológicos se apresenta como uma possibilidade para à obtenção do estágio adulto e assim a identificação taxonômica do parasito. Na literatura, destaca-se a revisão realizada por Yamaguti (1975), apresentando os trematódeos digeneicos com ciclos biológicos elucidados

experimentalmente. Estes tipos de pesquisas fornecem informações cruciais, não só na resolução dos ciclos de vida dos trematódeos, mas também uma maior compreensão de sua história evolutiva (PEARSON, 1972; CRIBB et al., 2003). Contudo, é importante mencionar que o sucesso neste tipo de abordagem experimental é dependente da complexidade do ciclo de vida, da especificidade do parasito pelo hospedeiro e das variações no desenvolvimento induzidas pelo modelo experimental (BLASCO-COSTA; POULIN, 2017).

A incorporação de técnicas moleculares na distinção de espécies de trematódeos vem sendo atualmente uma abordagem frequente (OLSON; TKACH, 2005; BLASCO-COSTA et al. 2016). Entre elas, destacam-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o sequenciamento com alvo no ácido desoxirribonucleico (DNA, *deoxyribonucleic acid*), que hoje em dia são ferramentas consideradas essenciais na rotina dos taxonomistas (PRASAD et al., 2009; PÉREZ-PONCE DE LEÓN & HERNÁNDEZ-MENA, 2019). As informações obtidas através da comparação de sequências moleculares são utilizadas para a exploração da diversidade de trematódeos, elucidação de ciclos biológicos e estudos filogenéticos (NOLAN; CRIBB, 2005). Os genes mais utilizados para estes propósitos são os ribossomais e mitocondriais (BLASCO-COSTA et al., 2016; MOSZCZYŃSKA et al., 2019; VAN STEENKISTE et al., 2015).

A unidade ribossômica nuclear está compreendida pelas subunidades menor (18S) e maior (28S), espaçadores internos transcritos (ITS, *internal transcribed spacer*) e regiões de espaçamento intergênico (IGS, *intergenic spacer*) (BLAIR, 2006; LITTLEWOOD, 2008). Os marcadores ribossomais apresentam regiões altamente conservadas, o que permite que o desenho de primers universais seja relativamente simples, e também possuem regiões variáveis, contendo informações filogenéticas (PERKINS et al., 2011). Do DNA ribossomal, sequências das subunidades 18S e 28S têm sido usadas para estimar a história evolutiva da classe Digenea, obtendo resultados consistentes e sendo possível emendar categorias taxonômicas superiores, assim como a revisão e descrição de táxons (OLSON et al., 2003; PÉREZ-PONCE DE LEÓN & HERNÁNDEZ-MENA, 2019).

Com relação aos genes do DNA mitocondrial, eles apresentam uma taxa de mutação maior em comparação aos nucleares, possuindo várias vantagens, como um melhor conhecimento da diversidade, identificação de espécies e detecção de variação genética de populações (BLASCO-COSTA et al., 2016). Uma abordagem de importância taxonômica é o *DNA barcoding*, cujo objetivo é amplificar um fragmento de

aproximadamente 600 nucleotídeos da subunidade I da enzima citocromo oxidase (*cox1*), conhecida como código de barra (KRESS et al., 2015). O desenho de primers universais para esta região tem permitido incrementar o número de sequências para trematódeos digeneicos (FOLMER et al., 1994; MOSZCZYNSKA et al., 2009; VAN STEENKISTE et al., 2015). Adicionalmente, nos últimos anos, o gene da subunidade I da nicotinamida adenina dinucleotídeo (*nad1*) vem recebendo atenção de pesquisadores no estudo de representantes da família Clinostomidae (ROSSER et al., 2018) e da superfamília Echinostomatoidea Looss, 1899 (GEORGIEVA et al., 2014; HERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2018).

No Brasil, os estudos moleculares envolvendo trematódeos são escassos e recentes, sendo verificado um aumento na geração de sequências nos últimos anos. Após uma revisão bibliográfica de trabalhos que abordaram a caracterização molecular de trematódeos digeneicos no país (Apêndice), observou-se um aumento significativo a partir do ano 2018, como representado na figura 1. Essa tendência também é verificada no uso de genes (Figura 2), com um incremento no caso de *cox1*, e a implementação do uso do marcador *nad1*. Contudo, os genes nucleares como 28 e ITS ainda são fundamentais, principalmente em estudos filogenéticos a nível de família ou superfamília (PANTOJA et al., 2019; ALVES et al., 2020). Assim, o uso de ferramentas moleculares, associado a descrição morfológica de formas larvais no território tem permitido a detecção de moluscos vetores de alguns representantes das famílias Clinostomidae (PINTO et al., 2015a), Echinostomatidae (PINTO et al., 2013, 2016), Notocotyliidae (ASSIS et al., 2019), Schistosomatidae (PINTO et al., 2017), Spirorchiidae (PINTO et al., 2015b; CICHETO et al., 2020), e da superfamília Diplostomoidea (LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019; QUEIROZ et al., 2019). Estudos experimentais, apesar da complexidade, ainda estão sendo aplicados a este tipo de enfoque, possibilitando a identificação de novas interações biológicas (PINTO et al., 2017; LOPES et al., 2020; LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2018; 2019).

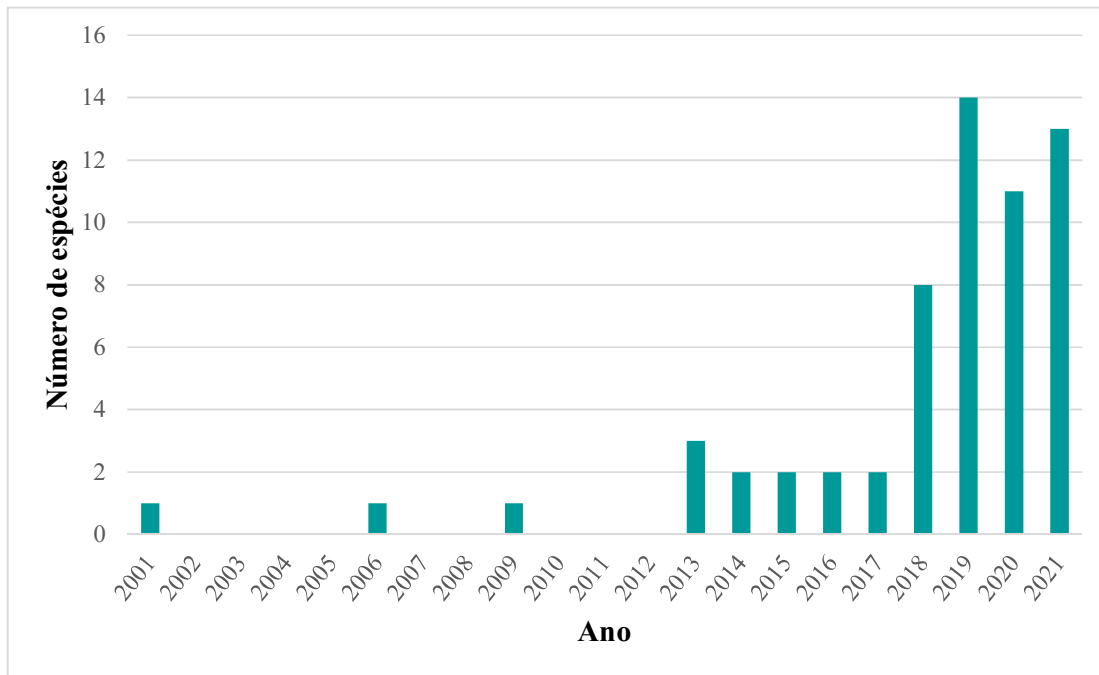


Figura 1 – Número de espécies de trematódeos digenéticos caracterizados molecularmente em estudos taxonômicos brasileiros desde 2001 até 2021.

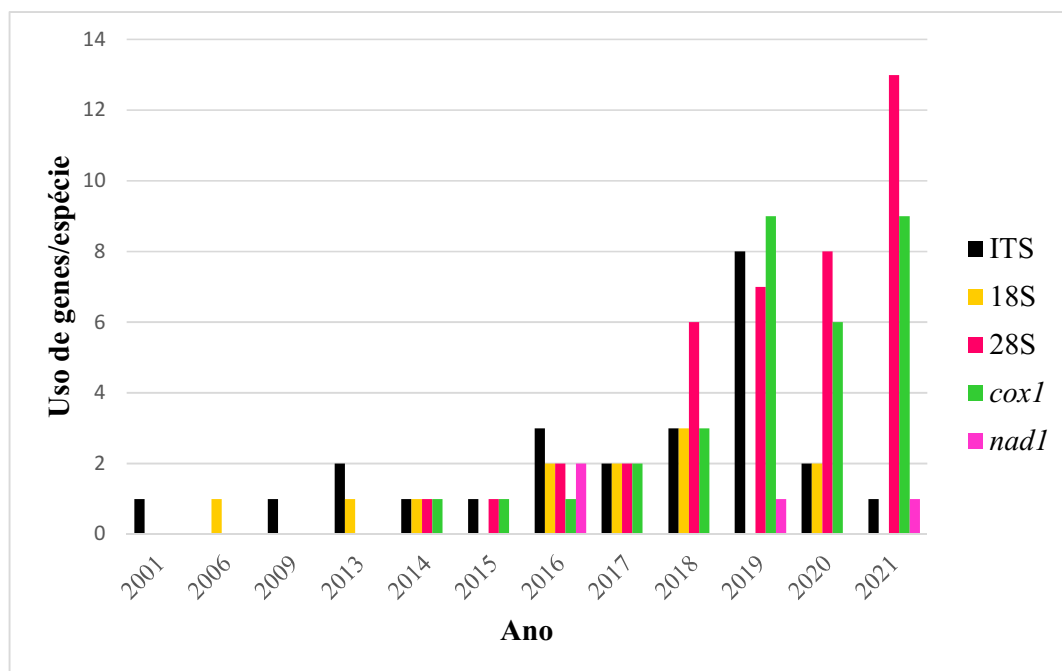


Figura 2 – Uso de marcadores nucleares (18S, 28S, ITS) e mitocondriais (*cox1* e *nad1*) na caracterização de trematódeos digenéticos em publicações científicas realizadas entre 2001 e 2021 no território brasileiro.

## 2 JUSTIFICATIVA

A bacia do Rio São Francisco, localizada inteiramente no território brasileiro, apresenta uma grande importância ecológica além da relevância social, econômica e cultural para a população. Apesar da diversificada fauna de vertebrados que ocorre neste rio que atravessa diferentes biomas brasileiros, há lacunas no conhecimento sobre a taxonomia e biologia das espécies de helmintos existentes neste ambiente fluvial. De fato, estudos visando caracterizar a diversidade de trematódeos digenéticos na bacia do RSF têm sido focados exclusivamente em peixes, com relatos de espécies de importância na piscicultura ou com potencial zoonótico. Apesar da malacofauna existente neste rio ser rica, pesquisas envolvendo a participação de moluscos na transmissão de trematódeos são escassas. Por outro lado, o estudo morfológico do estágio larval emergente do molusco, a cercária, não possibilita na maioria das vezes uma identificação específica. Contudo, outras abordagens como a realização de infecção experimental e o uso de marcadores moleculares vêm apresentando excelentes resultados na identificação de interações entre moluscos e trematódeos bem como na elucidação de novos ciclos biológicos destes parasitos. Sendo assim, estudos visando explorar estes aspectos podem contribuir para ampliar o conhecimento da fauna de trematódeos neste que é um dos rios mais importantes do Brasil.

### **3 OBJETIVOS**

#### **Objetivo geral**

Avaliar a transmissão de trematódeos digenéticos por moluscos dulciaquícolas do Rio São Francisco, na cidade de Januária, Minas Gerais, Brasil.

#### **Objetivos específicos**

- Avaliar a infecção natural de moluscos por larvas de trematódeos;
- Pesquisar estágios evolutivos de trematódeos em outros hospedeiros (peixes, girinos e insetos aquáticos) potencialmente envolvidos nos ciclos biológicos dos parasitos detectados nos moluscos;
- Realizar estudos de infecção experimental a partir das larvas de trematódeos encontradas (cercária ou metacercária) visando a obtenção de outros estágios evolutivos;
- Caracterizar por abordagem morfológica e molecular os estágios evolutivos dos trematódeos obtidos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

O município de Januária está localizado no norte do estado de Minas Gerais, a 596 km de Belo Horizonte. Faz divisa com o estado de Bahia e está situado na margem esquerda da Bacia do Rio São Francisco, na região do Médio São Francisco. Apresenta uma extensão de 6.661,588 km<sup>2</sup> e conta com uma população de 65.463 habitantes (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE, 2021). A economia é baseada na agropecuária, indústria e serviços gerais. Além disso, a pesca artesanal é uma atividade praticada pela população, sendo uma fonte de renda e sustento. Como atrativos turísticos, destacam-se o Parque Nacional Cavernas do Peruaçu e o pântano do rio Pandeiros. Em 2013 foi inaugurada a praia de Januária, um espaço de lazer para atividades recreativas e esportivas, que recebe turistas durante os meses de junho e agosto (<https://januaria.mg.gov.br>).

O clima de Januária, de acordo com a classificação de Köppen (1900), é Aw o que corresponde a um clima tropical, com inverno seco e estação chuvosa entre os meses de novembro e março. Segundo a Norma Meteorológica (período de 1981-2010) do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, <http://www.inmet.gov.br/portal/>), a temperatura média anual é de 24,1°C (temperatura mínima de 13,7°C, e a máxima 34°C), com precipitação média anual de 586,7 mm e umidade relativa média de 65,4%. Nesta região norte do estado, ocorre o encontro de dois biomas, o Cerrado e a Caatinga, apresentando uma vegetação predominantemente xerofítica e caducifólia (LOMBARDI et al., 2005).

Para as atividades de campo, foram selecionados três pontos acessíveis às margens do rio (Figura 3). As coordenadas geográficas foram obtidas com auxílio do servidor Google Earth (<https://earth.google.com/web/>). O ponto de coleta A (15° 29' 43,53"S; 44° 21' 45,41"O) encontra-se próximo a uma estação de captação de água pela Companhia de Saneamento de Minas Gerais (COPASA – MG) no Rio São Francisco (Figura 4A), o ponto B (15° 29' 4,02"S; 44° 20' 21,46"O) localiza-se na praia de Januária (Figura 4B) e o ponto C (15° 28' 54,80"S; 44° 20' 30,80"O) corresponde a um canal lateral à calha principal do rio que origina lagoas marginais durante a estação seca (Figura 4, C e D)



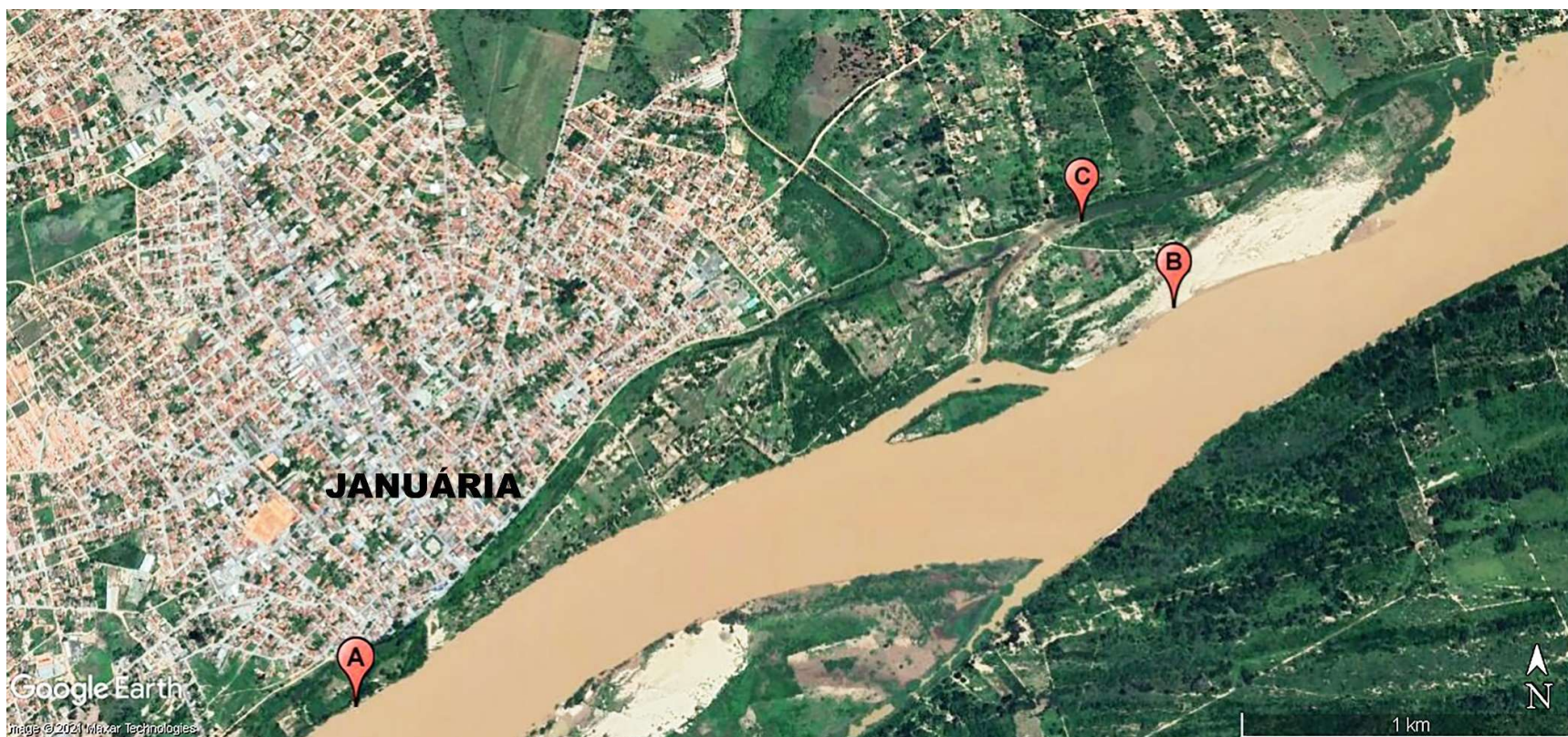


Figura 3 – Vista área dos três pontos de coletas malacológicas (A, B e C) localizados no município de Januária. Fonte: Google Earth.



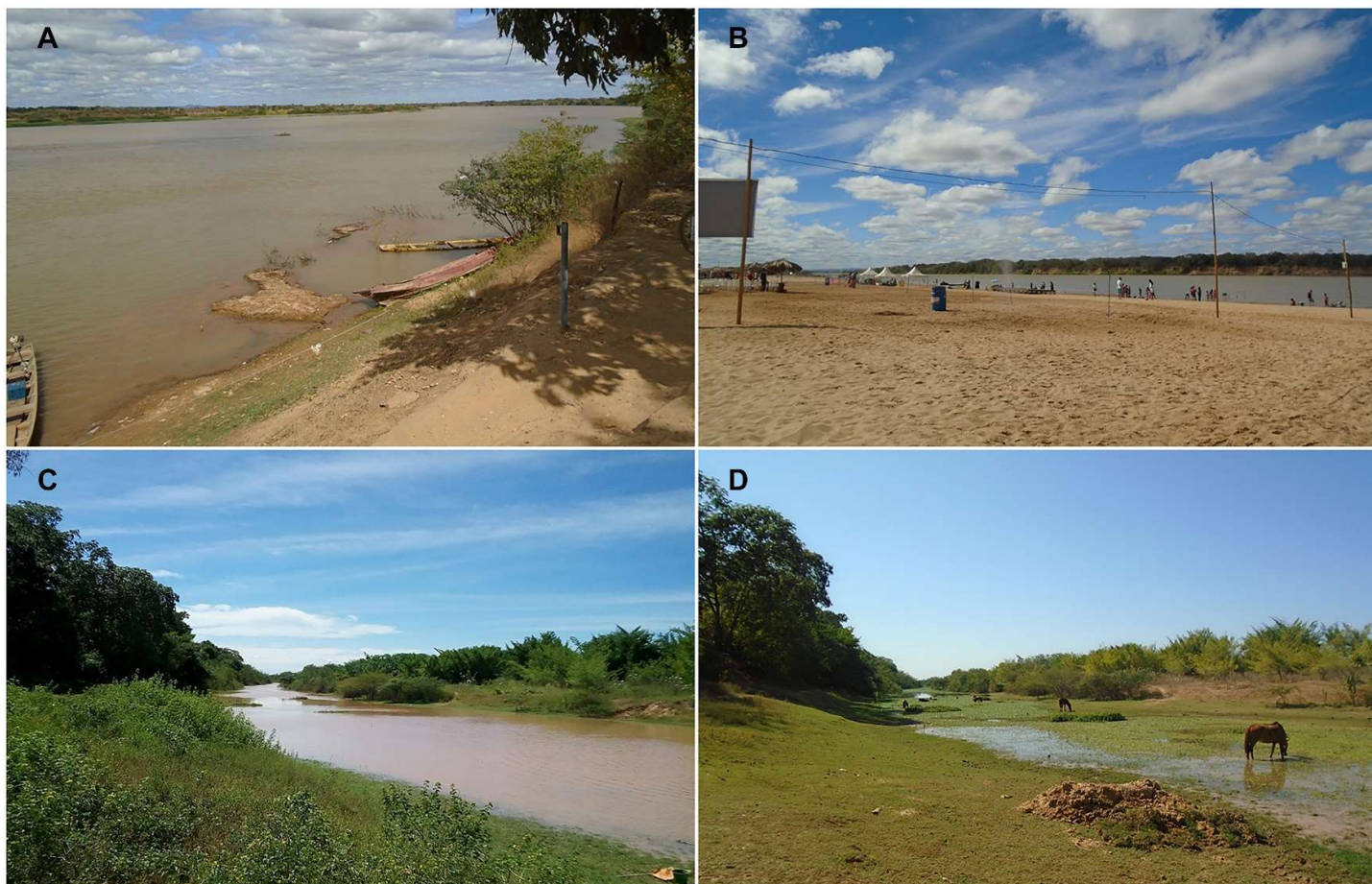


Figura 4 – Vistas panorâmicas dos pontos de coletas selecionados no município de Januária. (A) Ponto próximo da estação de captação de água pela COPASA, (B) praia de Januária e o canal lateral a calha principal (C) na época chuvosa e (D) seca.

## **4.2 Coletas de moluscos**

Entre julho de 2017 e agosto de 2019 foram realizadas 14 visitas à cidade de Januária com uma duração aproximada de uma semana em cada ocasião e com um intervalo de 30 a 60 dias. Durante esse período, foram feitas 64 coletas malacológicas: nove no ponto A, 23 no ponto B e 32, no C. Cabe ressaltar que as coletas em cada ponto foram realizadas em diferentes dias. No mês de fevereiro de 2018 foram executadas coletas, porém, foi verificado que condições climáticas foram desfavoráveis às atividades (chuvas intensas), dificultando o acesso aos pontos de amostragem. Assim, foi descartada a realização de atividades de campo na época chuvosa no seguinte ano.

Os moluscos foram coletados com auxílio de uma rede de nylon em forma de D, a qual foi passada pelas margens do Rio São Francisco e das lagoas marginais temporárias próximas, percorrendo entre 30 a 50 metros em cada ponto. Foi considerado um esforço amostral entre 60 e 90 minutos.

Todo o material coletado em cada dia foi depositado em um balde plástico (volume 10 L) e transportado ao Centro Avançado de Tratamento e Pesquisa em Leishmaniose Martha Bethânia Lima, localizado no centro da cidade de Januária, onde uma estação de trabalho contendo os aparatos necessários para as análises parasitológicas era montada em cada ocasião. Ressalta-se que os moluscos procedentes do Rio São Francisco foram transportados submersos em água do mesmo para garantir a sobrevivência, enquanto os coletados nas lagoas, foram acondicionados em sacos de plástico. No mesmo dia das coletas, realizou-se o processo de triagem, em que os moluscos eram separados de materiais orgânicos diversos, sendo lavados em água corrente e submetidos à avaliação da infecção por larvas de trematódeos.

## **4.3 Avaliação da infecção dos moluscos por larvas de trematódeos**

Os moluscos foram colocados individualmente em placas de poliestireno para cultura de células de seis, 12 ou 24 poços, contendo água mineral comercial. Em seguida, para detectar a emergência de cercárias, foram expostos à fotoestimulação artificial (lâmpada de 60W) por duas horas e examinados com auxílio de microscópio estereoscópico. Novos exames foram realizados na manhã seguinte, antes e após

fotoestimulação, assim como a contagem dos moluscos. Os exemplares infectados foram separados, codificados e transportados individualmente (envoltos em algodão úmido) para o Laboratório de Biologia de Trematoda do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, onde foram realizados os estudos morfológicos, experimentais e moleculares visando a identificação dos tipos cercarianos encontrados.

As formas intramolusco da maioria dos tipos cercarianos detectados foram observadas após compressão mecânica, entre lâminas ou placas de vidro, exemplares de moluscos infectados.

#### **4.4 Identificação morfológica dos moluscos**

Para o processo de identificação taxonômica dos moluscos foram utilizados exemplares de cada morfotipo encontrado. De forma geral, a identificação das espécies foi baseada segundo critérios conquiológicos, de acordo com Simone (2006). No caso de representantes gênero *Biomphalaria*, uma amostra de exemplares de cada morfotipo foi avaliada. Os moluscos selecionados foram mortos em água a 70°C, e em seguida as partes moles dos animais foram cuidadosamente removidas com o auxílio de pinça e fixadas em líquido de Railliet-Henry. Posteriormente, os animais foram dissecados em microscópio estereoscópico de acordo com Deslandes (1951). A identificação das espécies através de critérios conquiológicos e de morfologia interna segundo Paraense (1975). Para confirmação da identificação dos tiarídeos nativos, conchas dos moluscos foram enviadas ao Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, para a determinação taxonômica e depósito em coleção malacológica.

#### **4.5 Pesquisa de formas evolutivas em outros hospedeiros**

Larvas de Odonata (Insecta) e girinos (Anura) coletados durante os estudos malacológicos foram dissecados visando à procura de metacercárias. Para isso, foram colocados em placas de Petri, submersos em solução salina e dissecados em estereomicroscópio com o auxílio de estiletes.

Peixes pequenos (geralmente menores que 10 centímetros) coletados acidentalmente durante as atividades de campo, também foram avaliados quanto à infecção por trematódeos. De forma complementar, peixes adquiridos por pescadores artesanais foram também avaliados quanto a infecção por trematódeos [Autorização número 65447-1 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (Anexo)]. Foi realizado um exame macroscópico da superfície externas dos exemplares. Posteriormente, as vísceras (trato intestinal, globo ocular e cérebro) dos exemplares foram extraídas, colocadas de forma separadas em placas, submersos em solução salina (NaCl 0,85%) e analisados em estereomicroscópio.

## **4.6 Estudos experimentais**

### **4.6.1 Obtenção de metacercárias**

Trabalhos experimentais visando a obtenção de outros estágios de desenvolvimento foram realizados a partir das larvas de trematódeos encontradas. O provável padrão de ciclo biológico foi inferido pela identificação preliminar dos tipos cercarianos encontrados. Assim, determinou-se que entre as larvas encontradas havia espécies em que o ciclo biológico envolve a formação de metacercárias, em peixes (estrigocercária, lofocercária, pleurolofocerca com ou sem ocelos, e magnacauda) ou em substrato sólido (anfistoma, megalura e monostoma). Visando recuperar uma quantidade suficiente de cercárias para estes estudos, foram realizadas novas fotoestimulações dos moluscos previamente encontrados infectados.

No caso daquelas cercárias que formam metacercárias em substrato sólido, o encistamento das larvas nos poços das placas ou nas conchas dos mesmos moluscos foi observado em estereomicroscópio. A recuperação das metacercárias dos tipos cercarianos anfistoma e monostoma foi realizada cuidadosamente com auxílio de estiletos de ponta fina. Para o tipo megalura, as larvas encistadas foram submetidas à água quente (42°C), de acordo com Cheng e Thakur (1967).

Para os tipos cercarianos em que foi possível inferir o envolvimento de peixes como segundo hospedeiro intermediário, utilizou-se como modelo experimental *Poecilia reticulata* Peters 1859 (Pisces: Poeciliidae) criados e mantido em laboratório isentos de

infecção por trematódeos. Nos ensaios biológicos para cada trematódeo avaliado, foram utilizados grupos de 5 – 10 exemplares adultos (de ambos os sexos) com 2 a 4 cm de comprimento total. Os peixes foram colocados individualmente em placas de poliestireno para cultura de células de seis poços (contendo água isenta de cloro), sendo adicionada em seguida uma alíquota de solução com aproximadamente 50 ou 100 cercárias. Após 24 horas, os animais foram transferidos para aquários devidamente rotulados. Em alguns casos em que se verificou a ocorrência de poucas larvas emergidas, optou-se pela realização de infecção em massa. Para isso, grupos de *P. reticulata* foram colocados em um aquário juntamente com o molusco infectado por 2-3 dias. Os peixes expostos às cercárias foram mantidos entre 15-25 dias em aquários aerados com capacidade de 1L-2L e alimentados diariamente com ração em flocos para peixes ornamentais (Nutra Fish, Campinas, SP).

Visando a pesquisa de metacercárias, os peixes experimentalmente infectados foram anestesiados por meio de imersão em uma solução de benzocaína na concentração de 25 mg/L (Sigma-Aldrich, EUA). Os órgãos da cavidade abdominal, brânquias e as aletas foram transferidos para placas de vidro contendo solução fisiológica (NaCl 0,85%) e examinadas em estereomicroscópio para a pesquisa das formas parasitárias.

#### **4.6.2 Infecção experimental de hospedeiros definitivos**

Visando a obtenção de parasitos adultos, amostras das metacercárias obtidas em laboratório ou recuperadas em organismos naturalmente infectados (moluscos ou girinos) encontrados durante as coletas, foram utilizadas em tentativas de infecção de modelos experimentais.

*Mus musculus* (Linnaeus, 1758) (Rodentia: Muridae) da linhagem Swiss foram infectados por metacercárias provenientes do tipo cercariano anfistoma, assim como as encontradas naturalmente em *B. straminea* (Echinostomatidae) e em girinos (Strigeidae). Para cada uma destas espécies de trematódeos foram utilizados dois camundongos, nos quais as formas infectantes foram inoculadas por via oral com auxílio de uma micropipeta. Desde o primeiro dia de infecção, os roedores receberam uma dose diária de 50mg/kg, por via subcutânea, de fosfato dissódico de dexametasona (Decadron®, Aché, Brasil). Durante o tempo do experimento, os camundongos foram mantidos em condições

de laboratório, com água e alimentação (ração para animais de laboratório Labina, Purina®, Brasil) *ad libitum*.

Para o tipo cercariano megalura, as metacercárias termicamente desencistadas foram inoculadas em *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758) (Galliformes: Phasianidae) jovens. Neste caso, duas aves foram infectadas pela via ocular, recebendo 30 e 45 metacercárias em cada olho com auxílio de uma micropipeta. As aves foram adquiridas em um estabelecimento comercial da cidade de Belo Horizonte e mantidas em gaiolas, sendo água e alimentação fornecida *ad libitum* até a conclusão do ensaio.

#### **4.6.3 Exame parasitológico**

A avaliação do sucesso das infecções experimentais realizadas foi realizada segundo o modelo de hospedeiros definitivos utilizado. Para o modelo murino, amostras de fezes foram coletadas a partir do quinto dia pós-infecção (DPI) e processadas pelo método de sedimentação espontânea (Lutz, 1919). Nas aves infectadas, foram realizadas observações do saco conjuntival e membrana nictitante na terceira semana pós-infecção, para determinar a presença ou ausência de vermes.

#### **4.6.4 Recuperação de parasitos adultos**

Os animais infectados experimentalmente foram eutanasiados pela administração intraperitoneal de uma superdosagem de pentobarbital sódico. A cavidade abdominal dos camundongos foi exposta, as vísceras removidas e transferidas uma placa de Petri contendo solução fisiológica. O intestino delgado foi dividido em três porções (anterior, médio e posterior) e aberto longitudinalmente com auxílio de tesoura e pinças. O ceco intestinal foi dilacerado cuidadosamente com estiletes. Em seguida, a mucosa intestinal foi raspada com ajuda de lâminas de vidro e o conteúdo foi examinado em estereomicroscópio. Os parasitos encontrados foram coletados mediante o uso de pincéis. Em relação às aves, em cada olho foi realizada uma secção do saco conjuntival e da pálpebra superior com auxílio de uma tesoura para a recuperação de parasitos.

#### 4.6.5 Comitê de ética

Os ensaios experimentais utilizando-se vertebrados foram realizados de acordo com os princípios éticos em experimentação animal e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 20/2016) e tomando em conta as considerações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013).

#### 4.7 Estudo morfológico dos estágios evolutivos

Para o estudo dos tipos cercarianos, as larvas emergidas dos moluscos naturalmente infectados foram coletadas com auxílio de micropipeta para a confecção de preparações não-permanentes. Para isso, um pequeno volume de solução contendo algumas cercárias era transferido para lâmina de vidro e em seguida adicionava-se uma gota de corante vital (solução aquosa de vermelho neutro e sulfato azul do Nilo a 0,05%) e em seguida cobria-se com uma lamínula antes da visualização em microscópio de luz. Além disso, cercárias foram mortas em água a 70°C e fixadas em formalina 10% (formaldeído a 4 %). Este último material foi utilizado para a obtenção de dados morfométricos. No caso das formas intramolusco (esporocisto ou rédia), foram feitas observações em microscópio de luz do material a fresco e conservados no fixador.

As metacercárias obtidas experimentalmente e as encontradas em hospedeiros naturalmente infectados, foram fixadas como descrito acima para cercárias. Para o procedimento de fixação de parasitos adultos, os exemplares foram distendidos entre lâminas de vidro, mortos em água a 70°C e fixados em formalina 10%.

O material fixado (cercárias, metacercárias e formas adultas) foi utilizado para a confecção de preparações permanentes. Para isso, os parasitos foram submetidos a processo de coloração pelo carmin aceto-alúmen, desidratados em série crescente de etanol (70°, 80°, 90° e 99.8°), clarificados em creosoto de Faia e montados entre lâmina e lamínula em bálsamo do Canadá.

As mensurações dos estágios evolutivos foram realizadas com auxílio de ocular micrometrada em microscópio Olympus BH2. Os dados morfométricos foram expressos



em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), tabulados e analisados em software Microsoft® Excel 2016. Os registros fotográficos dos parasitos obtidos (fixados e/ou *in vivo*) foram obtidos com câmera digital Leica ICC50 HD e analisados em software Leica Application Suite (LAZ EZ), versão 2.0. No caso de parasitos maiores que 2 mm, as fotografias foram obtidas com auxílio de câmera digital (Sony Cyber-shot DSC-W320 14.1 Megapixels) acoplada em microscópio estereoscópico Leica EZ4. Posteriormente, as imagens obtidas foram editadas com o programa Photoshop CC versão 23.0.0.

A identificação dos tipos cercarianos foi realizada segundo descrições morfológicas preconizadas por diversos autores (DAWES, 1946; SCHELL, 1970; FRANDSEN; CHRISTENSEN, 1984; PINTO; MELO, 2013c). A determinação dos parasitos adultos obtidos experimentalmente até a categoria taxonômica de gênero foi realizada segundo chaves de identificação de trematódeos (GIBSON et al., 2002; JONES et al., 2005; BRAY et al., 2008). Para a identificação em nível específico, trabalhos descritos por diversos autores foram considerados para comparação e caracterização dos parasitos.

Preparações permanentes, assim como material fixado em formalina, foram depositados na Coleção de Trematódeos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-TRE).

## **4.8 Caracterização molecular**

### **4.8.1 Fixação de amostras, extração e quantificação de DNA**

Amostras dos parasitos recuperados, tanto dos moluscos como de outros organismos naturalmente infectados, foram inicialmente transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Quando necessário, o sobrenadante foi removido com auxílio de uma micropipeta de 50  $\mu\text{L}$  após centrifugação. Após esta etapa, 1 mL de etanol a 99,8% foi adicionado em cada tubo, os quais foram rotulados e conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o processamento das amostras.

Antes da extração de DNA, as amostras foram lavadas três vezes com 200  $\mu\text{L}$  de água destilada para retirar o etanol. O material genético foi obtido através do uso de dois kits, selecionados de acordo com a quantidade de material disponível: *Wizard® Genomic*

*DNA Purification* (Promega, EUA) e *QIAamp® DNA Micro* (Qiagen, EUA). O primeiro foi utilizado quando da existência de um número elevado de cercárias (>300) e parasitos adultos (>2mm). Para este kit, seguiu-se o protocolo de isolamento de DNA genômico descrito para tecido animal (cauda de camundongo), conforme orientação do fabricante. Já o kit *QIAamp® DNA Micro* foi usado nos casos de pouca recuperação das larvas (<20) e outras formas parasitárias menores a 200 µm, de acordo com o protocolo de isolamento de DNA genômico de tecidos. A concentração do DNA extraído foi determinada pelo espectrofotômetro de microvolume NanoDrop Lite (Thermo Scientific, EUA). A pureza do DNA extraído levou em conta a relação 260/280 nm.

#### 4.8.2 Amplificação de DNA

Para a amplificação do DNA dos trematódeos encontrados pela técnica de PCR, foram selecionadas regiões que são extensivamente empregadas na identificação molecular e em inferências filogenéticas (BLASCO-COSTA et al., 2016). Do DNA ribossômico, a região compreendida por ITS1-5.8S-ITS2 e sequência parcial da subunidade maior (28S, região V1-V3) foram consideradas. Além disso, fragmentos de dois genes mitocondriais foram selecionados: subunidade I da proteína citocromo oxidase (*cox1*) e da subunidade I da NADH desidrogenase (*nad1*). Os iniciadores utilizados nas amplificações são apresentados na tabela 3, assim como as referências bibliográficas das condições de PCR (especificadas com asterisco).

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 µL, que incluiu: 12, 5µL de *Platinum Hot Start PCR Master Mix (2X)* (Invitrogen, EUA) ou *Phusion® High-Fidelity DNA Master Mix (2X)* (Thermo Scientific, EUA), 0,625 µl de cada *primer* (com uma concentração final de 0,1 µM cada), 8,75 µL de água ultrapura (Milli-Q) e 2,5 µL de DNA, com uma concentração entre 25 – 50 ng. Adicionalmente, foi incluído o uso de controles, tanto positivo (da biblioteca molecular do laboratório) e negativo (substituição de DNA por água). A PCR foi realizada em um termociclador *Labcycler Basic* (SensoQuest, Alemanha). Para evidenciar o sucesso das reações, 2,5 µL dos produtos da PCR foram misturados com 0,5 µL com tampão de amostra (0,1% de azul de bromofenol, 0,1% de xilenocianol, 10% Ficoll 400), submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) (Promega, EUA) contendo 1,5 µL do corante de ácidos nucleicos

*Unisafe Dye*<sup>®</sup> (Uniscience, Brasil). A corrida eletroforética foi realizada a 100 V por 30 minutos em TAE 0,5X (Tris-Ácido acético-EDTA). Em seguida o gel foi visualizado em transluminador de luz UV. Nos casos em que as bandas de interesse eram fracas ou foi observada a presença de bandas inespecíficas, uma nova PCR foi realizada visando garantir quantidade suficiente de DNA após a etapa de purificação.

#### **4.8.3 Purificação dos produtos de PCR**

Os produtos de PCR apresentando banda única foram purificados com polietilenoglicol (PEG) (20% PEG 8.000 em solução de NaCl 2,5M) (Promega, EUA). O volume foi transferido a um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, adicionando em seguida PEG na mesma quantidade, homogeneizados em um vórtex e colocados em banho seco a 37°C por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi retirado cuidadosamente com auxílio de uma micropipeta. Em seguida, foram adicionados 125 µL de etanol 80° refrigerado aos tubos, os quais foram centrifugados por 5 min a 14.000 rpm. Após esta etapa, realizou-se o descarte do sobrenadante e foi repetido o passo anterior. Todo rastro de etanol foi eliminado através da exposição dos tubos em banho seco a 37°C por 30 – 60 minutos. Por fim, o precipitado foi ressuspensionado em 20 µL de água ultrapura e dosado em espectrofotômetro de microvolume.

Para os produtos de PCR com bandas inespecíficas foi utilizado o kit GFX<sup>®</sup> PCR DNA and Band Purification (GE Healthcare, Reino Unido). Os fragmentos de interesse foram excisados do gel de agarose com auxílio de uma lâmina de bisturi, purificados segundo o protocolo do fabricante, e posteriormente dosados como anteriormente descrito.

Tabela 3 – Primers utilizados para a amplificação e sequenciamento de genes ribossomais e mitocondriais dos parasitos encontrados no presente estudo. \*: Referências consideradas para as condições de PCR para cada par de primers, pb: pares de bases nucleotídica

Gene	Nome do primer	Direção	Família alvo	Tamanho (pb)	Uso	Referências
<b>Ribossomal</b>						
28S	Dig12	Forward	Universal	~1200	PCR/Seq	TKACH et al., 2003*
	1500R	Reverso				
ITS1-5.8S-ITS2	BD1	Forward	Echinostomatidae	~1000	PCR/Seq	LUTON et al., 1992 MORGAN; BLAIR, 1995*
	BD2	Reverso				
	D1	Forward	Diplostomidae	~900	PCR/Seq	GALAZZO et al., 2002*
	D2	Reverso				
<b>Mitocondrial</b>						
<i>cox1</i>	Plat-diploCOX1dF	Forward	Diplostomidae	~500	PCR/Seq	MOSZCZYNSKA et al., 2009*
	Plat-diploCOX1dR	Reverso				
	Dice1F	Forward	Universal	~600	PCR	VAN STEENKISTE et al., 2015*
	Dice11R	Reverso				
	T3	Forward	Universal	~600	Seq	
	T7	Reverso				
	JB3	Forward	Universal	~800	PCR/Seq	BOWLES et al., 1993 MIURA et al., 2005*
	COI-R-Trema	Reverso				
	JB4.5/COI-R-Trema	Forward				
	<i>nad1</i>	ND1J	Forward	Echinostomatidae	~500	PCR/Seq
ND1JA2			Philophthalmidae	MORGAN; BLAIR, 1998		

#### 4.8.4 Sequenciamento de DNA

Os produtos da PCR purificados foram sequenciados bidirecionalmente (forward e reverso) pelo método de Sanger. O sequenciamento foi realizado por eletroforese capilar com o sequenciador automático ABI3730, utilizando-se polímero BigDye v3.1 e POP7. A quantidade de DNA purificado e concentração de primers seguiram as orientações fornecidas pelas empresas envolvidas na realização desta etapa.

#### 4.8.5 Edição de sequências e análise filogenética

O programa ChromasPro versão 2.0.1 (Technelysium Pty Ltd, Austrália) foi utilizado para a avaliação e edição dos cromatogramas (formato ab1). As sequências consenso foram inicialmente submetidas à pesquisa de similaridade na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (*National Library of Medicine*, EUA), utilizando o servidor BLAST (*Basic Alignment Search Tools*) (ALTSCHUL et al., 1990). Alinhamentos das sequências obtidas no presente trabalho com as recuperadas do GenBank foram feitos pelo algoritmo CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994) implementado no programa MEGA 7.0 (KUMAR et al., 2016). Após esta etapa, os alinhamentos foram cortados em cada extremidade.

Para as análises filogenéticas, os modelos evolutivos de substituição nucleotídica foram selecionados segundo o critério de Inferência Bayesiana (SCHWARZ, 1978), implementado no MEGA 7. As árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB), usando os programas MEGA 7 e MrBayes 3.2.6 (RONQUIST et al., 2012), respectivamente. Na MV, a confiabilidade e robustez dos suportes nodais foram estimados por replicações não paramétricas de *bootstrap* (FELSENSTEN, 1985) com 1000 repetições. Na análise Bayesiana, os suportes nodais foram estimados pela probabilidade posterior Bayesiana, através das cadeias de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC), rodadas em duplicatas, quatro cadeias, 1000000 gerações, com uma frequência de amostragem a cada 100 gerações. A convergência dos parâmetros de cada corrida das cadeias de Markov foi verificado no programa Tracer 1.7.1 (RAMBAUT et al., 2018). Das árvores geradas, o

25% foi considerado como *burn-in* e descartado. As árvores consenso foram visualizadas em FigTree 1.4.3 e editadas em Photoshop CC.

Adicionalmente, as divergências genéticas entre os isolados encontrados com as demais espécies incluídas nas análises filogenéticas foram determinadas pelo cálculo das distâncias patrísticas (p) não-corrigidas no MEGA 7.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Coletas de moluscos e infecção por larvas de trematódeos

Em 14 expedições científicas na cidade de Januária, Minas Gerais, entre julho de 2017 e agosto de 2019, foram realizadas 64 coletas malacológicas nas margens do RSF. Um total de 11.690 exemplares de moluscos gastrópodes foram avaliados quanto à infecção por larvas de trematódeos, sendo identificadas 9 espécies pertencentes às famílias Ampullariidae, Lymnaeidae, Physidae, Planorbidae e Thiaridae (Figura 5, Tabela 4).

As espécies *Aylacostoma chloroticum* Hylton Scott, 1954 (Figura 5B) e *Aylacostoma tuberculatum* Wagner 1827 (Figura 5C) foram encontrados exclusivamente nos Pontos A e B, sendo detectada a participação destes tiarídeos na transmissão 5 e 11 morfotipos de cercárias, respectivamente. Destaca-se que dois morfotipos são transmitidos pelas ambas espécies de moluscos. Entre estes tiarídeos, *A. tuberculatum* foi a espécie predominante (74%) em ambas as áreas.

O molusco coletado em maior número e detectado apenas no ponto C foi *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) (Figura 5E), sendo responsável pela transmissão de 16 espécies de trematódeos. *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981 (Figura 5B), *Ancylinae* gen. sp. (Figura 5A), *Stenophysa marmorata* (Guilding, 1828) (Figura 5G) e *Pseudosuccinea columella* (Say, 1817) (Figura 5I) foram outras espécies encontradas na área de estudo. As duas primeiras demonstraram-se infectadas por uma larva de trematódeo cada. É importante mencionar que o único morfotipo detectado em *B. occidentalis* também foi encontrado em *B. straminea*. Os exemplares de *B. occidentalis* e *S. marmorata* foram coletados de forma esporádica em pequenos charcos próximos à beira do rio, não sendo observada a emergência de larvas de trematódeos nestas espécies.

Entre os moluscos coletados nos três pontos de amostragem, encontram-se *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) (Figura 5F), *S. marmorata* e *Pomacea* sp. (Figura 5H). Destas, apenas na primeira espécie foi verificada a infecção por um único morfotipo de cercária nos pontos A e C. Casos de co-infecção foram detectados de forma exclusiva em *A. chloroticum* (1/1281, 0,78%) e *A. tuberculatum* (3/3725, 0,80%).

A análise morfológica das cercárias revelou a ocorrência de 31 morfotipos sendo transmitidas por moluscos no RSF, na cidade de Januária, Minas Gerais. Os tipos cercarianos identificados foram: Anfistoma (1), Brevifurcada (5), Equinostoma (6), Estrigeocercária (5), Gimnocéfala (2), Lofocercária (1), Megalura (1), Monostoma (1), Pleurolofocerca (5), Xifidiocercária (4).

O total de moluscos coletados em cada dia nos três diferentes pontos de amostragem avaliados no presente estudo são apresentados nos Apêndices 1 (Pontos A e B) e 2 (Ponto C).



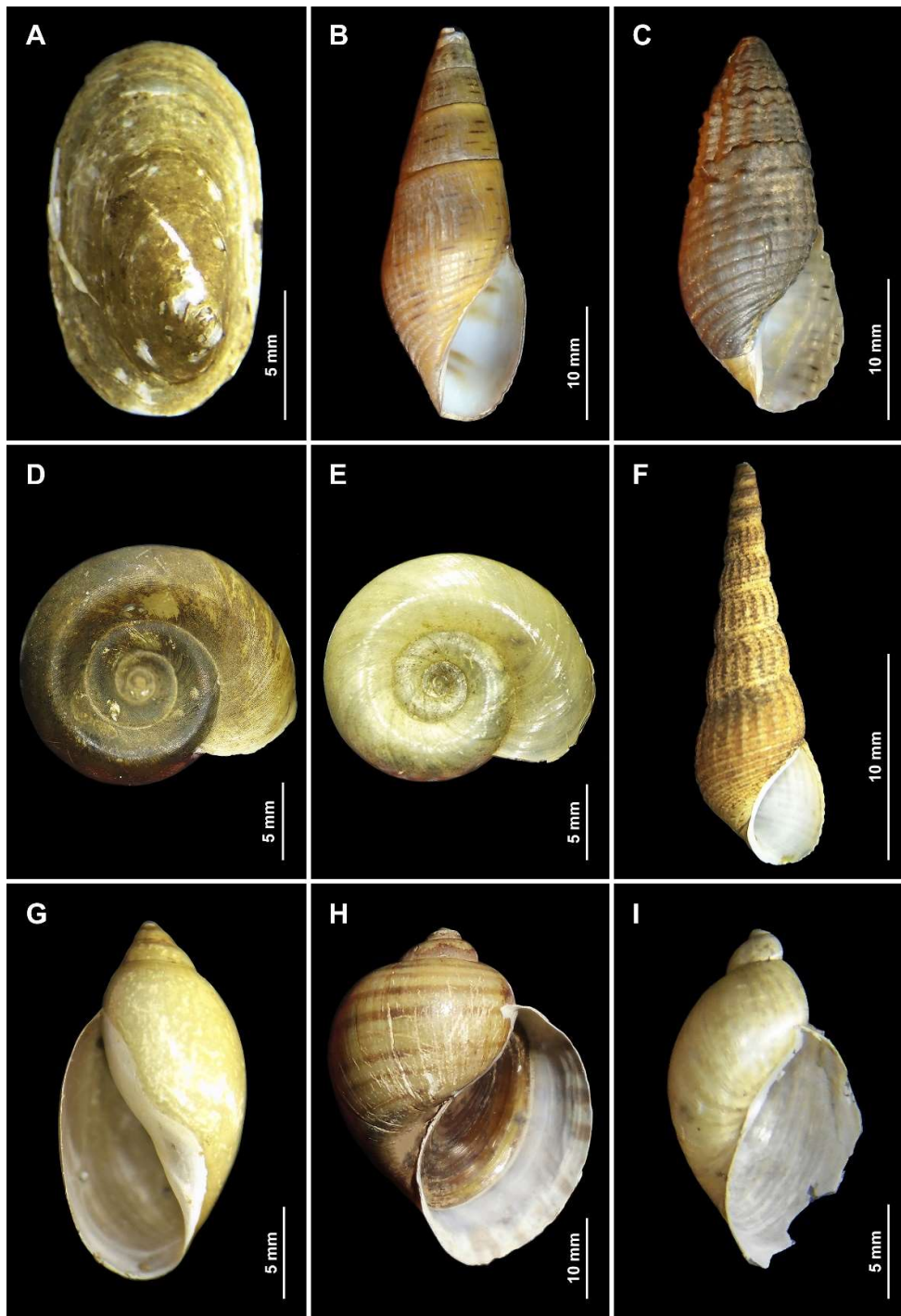


Figura 5 – Moluscos dulciaquícolos coletados no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (A) *Ancylinae* gen. sp., (B) *Aylacostoma chloroticum*, (C) *Aylacostoma tuberculatum*, (D) *Biomphalaria occidentalis*, (E) *Biomphalaria straminea*, (F) *Melanoides tuberculata*, (G) *Stenophysa marmorata*, (H) *Pomacea* sp. e (I) *Pseudosuccinea columella*.

Tabela 4 – Espécies de moluscos coletadas, número absoluto e relativo de exemplares infectados por larvas de trematódeos e número de espécies destes helmintos verificadas durante as atividades de campo realizados no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, entre julho de 2017 e agosto de 2019.

Molusco	Família	Coletados	Infectados	% de infecção	Nº de morfortipos cercarianos
<i>Ancylinae</i> gen. sp.	Planorbidae	144	5	3,47	1
<i>Aylacostoma chloroticum</i>	Thiaridae	1292	11	0,85	5
<i>Aylacostoma tuberculatum</i>	Thiaridae	3725	238	6,39	11
<i>Biomphalaria occidentalis</i>	Planorbidae	672	1	0,15	1
<i>Biomphalaria straminea</i>	Planorbidae	4806	112	2,33	16
<i>Melanoides tuberculata</i>	Thiaridae	590	2	0,34	1
<i>Stenophysa marmorata</i>	Physidae	289	0	-	0
<i>Pseudosuccinea columella</i>	Lymnaeidae	28	0	-	0
<i>Pomacea</i> sp.	Ampullaridae	144	0	-	0
<b>Total</b>		<b>11.690</b>	<b>369</b>	<b>3,16</b>	

## 5.2 Outros hospedeiros infectados por trematódeos

Foram avaliados 160 exemplares de peixes pertencentes a 25 espécies. Destes, 18 indivíduos (11,25%) apresentaram-se infectados por trematódeos, sendo detectada a ocorrência de 9 espécies (6 metacercárias e três formas adultas). Na tabela 5 são apresentados os parasitos identificados, os hospedeiros e sítios de infecção.

Um total de 78 girinos de *Rhinella* sp. foram avaliados quanto à presença de trematódeos, sendo verificada a presença de metacercária do tipo “Tetracotyle” (*Parastrigea* sp.) em todos os exemplares. Adicionalmente, 26 larvas de Anisoptera (Odonata) foram examinadas, sendo observada a presença de um morfotipo de metacercária (Phaneropsolidae gen. sp.) em 9 (34,6%) espécimes. Os cistos foram encontrados aderidos ao tecido da região abdominal destes insetos.

## 5.3 Espécies encontradas em moluscos

Um total de 31 espécies de trematódeos foi verificado em moluscos no RSF durante o presente estudo. Destas, 29 tiveram a identificação taxonômica complementada através de caracterização molecular. Ademais, ferramenta possibilitou detectar outros hospedeiros intermediários ou definitivos de três destes tipos cercarianos. Dois morfotipos foram identificados em nível específico exclusivamente pela obtenção de parasitos adultos em modelos experimentais. Metacercária de três espécies foram obtidas experimentalmente em *P. reticulata*. Na tabela 6 são listados os trematódeos identificados até a menor categoria taxonômica possível, além dos respectivos tipos cercarianos, moluscos hospedeiros, hospedeiros intermediários e/ou definitivos (naturais ou experimentais).

A seguir, são apresentadas as espécies de trematódeos agrupadas pelas superfamílias a que pertencem, seguindo uma ordem alfabética. São indicados o percentual de infecção total e o obtido em cada dia de coleta, com o respectivo ponto de amostragem. Os tipos cercarianos são descritos morfológica e molecularmente (quando possível), assim como dos estágios encontrados em outros hospedeiros naturais ou obtidos de forma experimental.

Tabela 5 – Lista de outros hospedeiros procedentes do Rio São Francisco avaliados no presente estudo.

Hospedeiros	Col	Inf	Forma parasitária	Estágio	Sítio de infecção
<b>Pisces</b>					
<i>Acestronrhynchus</i> sp.	1	0	-		-
<i>Astyanax bimaculatus</i>	19	0	-		-
<i>Astyanax</i> sp.	4	0	-		-
<i>Australoheros</i> sp.	12	1	Crassiphialinae gen. sp.	M	Olho
			<i>Austrodiplostomum compactum</i>	M	Olho
			<i>Clinostomum heluans</i>	M	Nadadeiras
<i>Cichla temensis</i>	1	0	-		-
Cichlidae gen. sp.	4	0	-		-
<i>Hoplias malabaricus</i>	1	1	<i>Pseudosellacotyla lutzi</i>	A	Intestino
<i>Leporinus taeniatus</i>	2	0	-		-
<i>Leporinus</i> sp.	9	0	-		-
<i>Myleus pacu</i>	4	3	Criptogonimidae gen. sp.	M	nadadeiras
<i>Oreochromis niloticus</i>	29	0	-		-
<i>Pimelodus fur</i>	4	0	-		-
<i>P. maculatus</i>	7	0	-		-
<i>Plagioscion squamosissimus</i>	1	0	-		-
Poecilidae gen. sp.	39	1	<i>A. compactum</i>	M	Olho
			<i>Apharyngostrigea</i> sp.	M	Superfície visceral
			<i>Posthodiplostomum nanum</i>	M	Superfície visceral
<i>Prochilodus argenteus</i>	1	0	-		-
<i>Prochilodus</i> sp.	8	0	-		-
<i>Pterygoplichthys</i> sp.	1	0	-		-
<i>Pygocentrus piraya</i>	1	0	-		-
<i>Salminus franciscanus</i>	2	2	<i>Neocladocystis intestinalis</i>	A	Intestino
<i>Serrapinus</i> sp.	3	0	-		-
<i>Serrasalmus brandtii</i>	3	0	-		-
<i>Serralsalmus</i> sp.	1	0	-		-
Siluriformes gen. sp.	1	0	-		-
<i>Synbranchus</i> sp.	2	0	-		-
<b>Amphibia</b>					
<i>Rhinella</i> sp. (girinos)	78	78	<i>Parastrigea</i> sp.	M	Superfície visceral
<b>Insecta</b>					
Anisoptera gen. sp. (larvas)	26	9	Phaneropsolidae gen. sp.	M	Tecido da região abdominal

Tabela 6 – Lista dos 31 trematódeos detectados durante as coletadas realizadas no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, entre os meses de julho de 2017 e agosto de 2019, considerando os respectivos hospedeiros naturais e experimentais. N: Natural; E: Experimental

Parasitas detectados	Tipo cercariano	1° Hospedeiro intermediário	2° Hospedeiro intermediário	Hospedeiro definitivo
<b>Superfamília Clinostomatoidea</b>				
<b>Família Clinostomidae</b>				
<i>Clinostomum heluans</i>	Lofocercária	<i>B. straminea</i>	<i>Australoheros</i> sp. (N) <i>P. reticulata</i> (E)	–
<b>Família Diplostomidae</b>				
<i>Austrodiplostomum compactum</i>	Estrigeocercária	<i>Biomphalaria straminea</i>	<i>Australoheros</i> sp. (N) Poecilidae gen. sp. (N)	–
<i>Hysteromorpha</i> sp.	Estrigeocercária	<i>B. straminea</i>	–	–
<i>Tylodelphys</i> sp.	Estrigeocercária	<i>B. straminea</i>	<i>Poecilia reticulata</i> (E)	–
<b>Família Strigeidae</b>				
<i>Cotylurus</i> sp.	Estrigeocercária	<i>B. straminea</i>	<i>B. straminea</i> (N)	–
<i>Parastrigea</i> sp.	Estrigeocercária	<i>B. straminea</i>	Girinos (N)	–
<b>Superfamília Echinostomatoidea</b>				
<b>Família Echinochasmidae</b>				
Echinochasmidae gen. sp.	Equinocercária	<i>Aylacostoma tuberculatum</i>	–	–
<i>Stephanoprora</i> sp. 1	Equinocercária	<i>A. tuberculatum</i>	–	–
<i>Stephanoprora</i> sp. 2	Equinocercária	<i>A. tuberculatum</i>	–	–
<b>Família Echinostomatidae</b>				
<i>Drepanocephalus</i> sp.	Equinocercária	<i>B. straminea</i>	–	–
<i>Echinostoma</i> sp.	Equinocercária	<i>B. straminea</i>	–	–
Echinostomatidae gen. sp.	Equinocercária	<i>B. straminea</i>	<i>B. straminea</i> (N)	–
<i>Ribeiroia</i> sp.	Gimnocéfala	<i>B. straminea</i>		–

Tabela 6 – *Continuação...*

Parasitas detectados	Tipo cercariano	1° Hospedeiro intermediário	2° Hospedeiro intermediário	Hospedeiro definitivo
<b>Família Philophthalmidae</b>				
<i>Philophthalmus</i> sp. nov	Megalura	<i>A. chloroticum/A. tuberculatum</i>	–	<i>Gallus gallus domesticus</i> (E)
<b>Superfamília Microphalloidea</b>				
Microphalloidea gen. sp.	Xifidiocercária	<i>A. chloroticum</i>	–	–
<b>Família Lecithodendriidae</b>				
Lecithodendriidae gen. sp. 1	Xifidiocercária	<i>A. chloroticum/A. tuberculatum</i>	–	–
Lecithodendriidae gen. sp. 2	Xifidiocercária	<i>A. tuberculatum</i>	–	–
<b>Família Phanerosolidae</b>				
Phanerosolidae gen. sp.	Xifidiocercária	<i>A. chloroticum/ A. tuberculatum</i>	Larva de Odonata (N)	–
<b>Superfamília Opisthorchioidea</b>				
<b>Família Cryptogonimidae</b>				
Cryptogonimidae gen. sp. 1	Pleurolofocerca	<i>A. tuberculatum</i>	–	–
Cryptogonimidae gen. sp. 2	Pleurolofocerca	<i>A. tuberculatum</i>	<i>Myleus pacus</i> (N)	–
<i>Pseudosellacotyla lutzi</i>	Pleurolofocerca	<i>A. tuberculatum</i>	–	<i>Hoplais malabaricus</i> (N)
<b>Família Heterophyidae</b>				
<i>Centrocestus formosanus</i>	Pleurolofocerca	<i>Melanoides tubercula</i>	–	–
Heterophyidae gen. sp.	Pleurolofocerca	<i>A. chloroticum</i>	–	–
<b>Superfamília Plagiorchioidea</b>				
<b>Família Plagiorchiidae</b>				
<i>Choledocystus</i> sp.	Gimnocéfala	Ancylinae gen. sp.	–	–

Tabela 6 – Continuação...

Parasitas detectados	Tipo cercariano	1° Hospedeiro intermediário	2° Hospedeiro intermediário	Hospedeiro definitivo
<b>Superfamília Pronocephaloidea</b>				
Notocotylidae gen. sp.	Monostoma	<i>B. straminea</i>	–	–
<b>Superfamília Paramphistomoidea</b>				
<b>Família Zygoctylidae</b>				
<i>Zygoctyle lunata</i>	Anfistoma	<i>B. straminea</i>	–	<i>Mus musculus</i> (E)
<b>Superfamília Schistosomatoidea</b>				
<b>Família Aporocotylidae</b>				
Aporocotylidae gen. sp. 1	Brevifurcada	<i>A. tuberculatum</i>	–	–
Aporocotylidae gen. sp. 2	Brevifurcada	<i>B. straminea</i>	–	–
<b>Família Schistosomatidae</b>				
Schistosomatidae gen. sp. 1	Brevifurcada	<i>B. straminea</i>	–	–
Schistosomatidae gen. sp. 2	Brevifurcada	<i>B. straminea</i>	–	–
<b>Família Spirorchidae</b>				
Spirorchidae gen. sp.	Brevifurcada	<i>B. occidentalis/B. straminea</i>	–	–

### 5.3.1 Supermília Clinostomatoidea Lühe, 1901

#### 5.3.1.1 Família Clinostomidae Lühe, 1901

##### 5.3.1.1.1 *Clinostomum heluans* Braun, 1901

Tipo cercariano: Lofocercária.

Primeiro hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,02% (1/4806).

Local de coleta: Ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 21/08/2019 (0,38%).

Segundo hospedeiro intermediário: *Australoheros* sp. (1/7, 14,8%) (Natural); *Poecilia reticulata* (Experimental).

*Estudo experimental*: 5 exemplares de *P. reticulata* foram expostos à uma solução de 50 cercárias, de forma individual. Aos 30 DPI, foi detectada a presença de um cisto de cor esbranquiçado na base da nadadeira caudal de um único indivíduo.

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=20): Larva com cauda bifurcada (Figura 6A). Corpo cercariano alongado, 133 (125–145) × 40 (36–45), com membrana dorsal estendida desde a extremidade posterior do órgão anterior até a região posterior do corpo (Figura 6B). Ocelos pigmentados, 6 (5–7) × 7 (5–9), pré-equatoriais. Órgão anterior oval, 43 (39–50) × 21 (20–25), coberto com microespinhos. Abertura oral localizada ventralmente na região posterior do órgão anterior. Esôfago de aspecto tubular que termina em uma dilatação (pós-equatorial). Ventosa ventral rudimentar, 13 (13–16) × 16 (13–20). Presença de cinco pares de glândulas de penetração localizadas na região pós-equatorial. Tronco caudal, 307 (263–327) × 31 (25–38), com tegumento espinhoso e estriações transversais. Furcas curtas, 117 (93–134) × 20 (18–23), coberto com microespinhos (Figura 6C). As larvas emergem após fotoestimulação e são produzidas por rédias alongados (Figura 6D). Comparações morfológicas da cercária com semelhantes reportadas por outros autores são apresentadas na tabela 7.



Metacercária (n=12): A descrição do estágio larval foi feita em base a espécimes coletados em *Australoheros* sp., encistados nas nadadeiras, com coloração amarelada. Corpo linguiforme, 2981 (2300–3192) × 582 (446–678), com a maior largura na região pré-acetabular (Figura 6E). Colar oral visível. Par de ocelos pigmentados, localizados antes da bifurcação intestinal. Presença de estruturas glandulares entre as ventosas. Ventosa oral, subterminal, 43 (38–48) × 33 (28–35). Faringe não observada. Cecos intestinais longos, laterais à ventosa ventral, com divertículos laterais, estendendo-se próximo do extremo posterior do corpo. Ventosa ventral arredondada, 333 (282–359) × 348 (260–380), pré-equatorial, no primeiro terço do corpo, com abertura triangular. Presença de dois testículos, pequenos, em tandem, com projeções digitiformes, na última porção do corpo. Testículo anterior, 56 (48–66) × 95 (78–131); testículo posterior 51 (38–64) × 100 (76–124). Ovário ovalado, 54 (47–66) × 30 (21–38), inter-testicular. Saco do cirro desenvolvido, 122 (112–138) × 44 (38–48). Útero tubular. As medidas da metacercária com as de *Clinostomum* spp. são apresentadas na tabela 8.

#### *Caracterização molecular*

Foram obtidos fragmentos do gene *cox1* (região *barcode*) da cercária (336 bp) e metacercária (370 bp). Foi construído um alinhamento com sequências de *Clinostomum* spp. e submetido a análise filogenética. Na reconstrução filogenética (Figura 7), evidenciou-se que ambos estágios larvais formaram um clado com isolados de *C. heluans*, com alto suporte nodal. A sequência obtida da metacercária apresentou 100% de identidade com um isolado de *C. heluans* previamente estudado no Brasil (BRIOSIO-AGUILAR et al., 2018). A divergência genética para o isolado dessa espécie reportada no México foi 0,3%. Não foi definida uma relação próxima com outra espécie do gênero pela presença de politomia. Apesar disso, foi observada a formação de um clado com espécies reportadas em Israel (*C. phalacrocoracis*), Nigéria (*C. tilapiae* e *C. ukoli*), Quênia (*C. cutaneam*) e Romênia (*C. sinensis*), com bom suporte. A divergência genética em relação a outras espécies relatadas no continente americano variou entre 15% e 22%.

*Comentários:* A cercária foi identificada como do tipo Lofocercária pela presença de membrana natatória dorsal no corpo cercariano (PINTO; MELO, 2013c). É semelhante às outras cercárias descritas para *Clinostomum* spp. por diferentes autores (KRULL, 1934; CHUNG, 1998; PINTO et al., 2015). Difere das larvas de *C. marginatum* Rudolphi, 1819 e *C. complanatum* Rudolphi, 1814 por possuir furcas maiores. Experimentalmente,

foi possível observar a formação de um único cisto na nadadeira caudal de *P. reticulata*. Metacercárias encistadas nas nadadeiras de *Australoheros* sp. assim como a cercária do tipo lofocerca foram analisadas molecularmente, o que suportou a identificação de *C. heluans*.

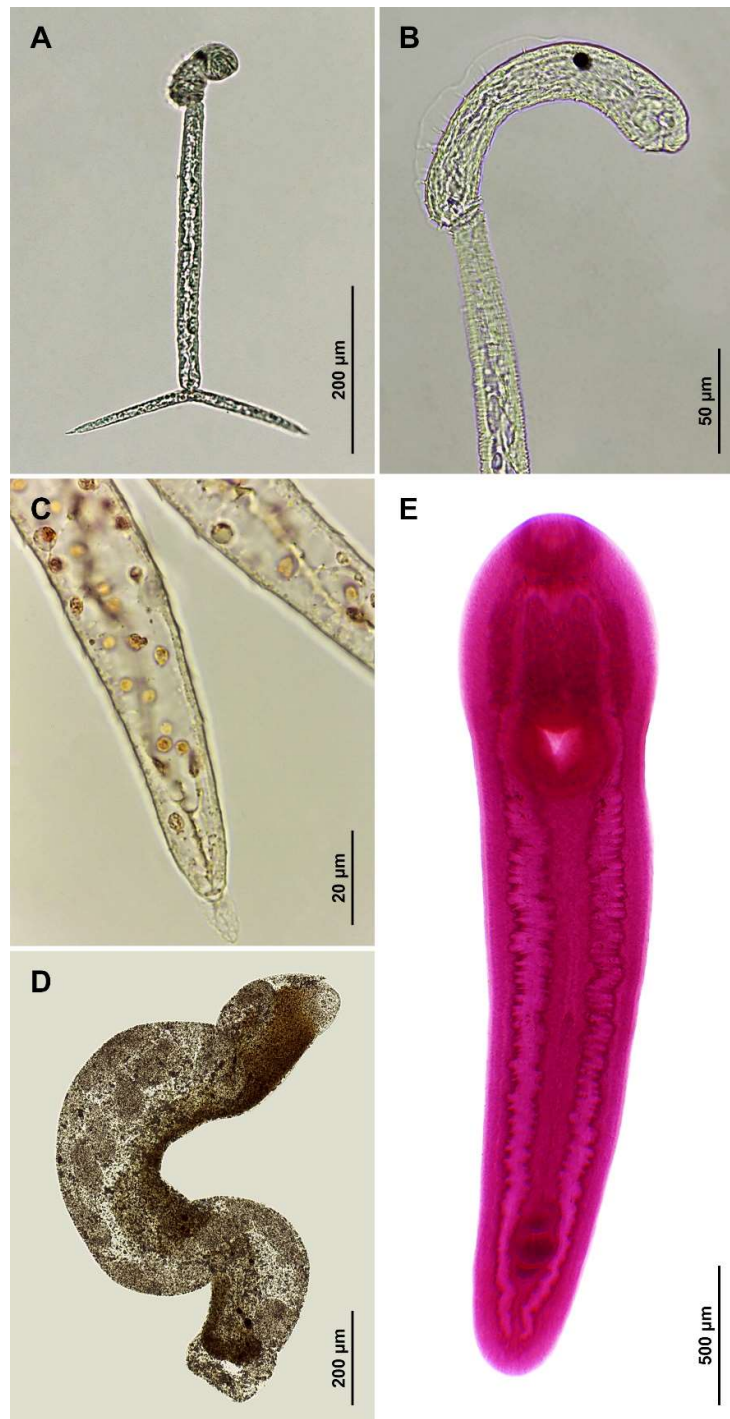


Figura 6 – *Clinostomum heluans*. (A) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Detalhe da membrana ondulante no corpo cercariano (C) Furca com microespinhos no tegumento, corada com vermelho neutro. (D) Esporocisto recuperado de molusco infectado. (E) Estágio adulto recuperado de *Australoheros* sp., corado pelo carmim.

Tabela 7 – Comparação morfométrica da larva emergida de *B. straminea* e de *Clinostomum* spp. reportados por diferentes autores. C: Comprimento; L: Largura.

		<i>Clinostomum heluans</i>	<i>C. marginatum</i>	<i>C. complanatum</i>	<i>Clinostomum</i> sp.
		Presente estudo	KRULL, 1934	CHUNG et al., 1998	PINTO et al., 2015a
Localidade			EUA	Coreia	Brasil
1° Hospedeiro intermediário		<i>Biomphalaria straminea</i>	<i>Helisoma antrosa</i>	<i>Radix auricularia</i>	<i>B. glabrata</i> , <i>B. straminea</i> , <i>B. tenagophila</i>
Corpo	C	133 (125-145)	130 (120-138)	127 (119-147)	110 (98-128)
	L	40 (36-45)	31 (30-32)	34 (33-36)	35 (32-42)
Órgão anterior	C	43 (39-50)	39 (37-40)	37 (33-41)	38 (33-47)
	L	21 (20-25)	-	23 (21-26)	24 (20-27)
Ventosa ventral	C	13 (13-16)	-	-	15 (12-18)
	L	16 (13-20)	-	-	16 (12-18)
Tronco caudal	C	307 (263-327)	268 (250-285)	320 (275-370)	288 (273-307)
	L	31 (25-38)	-	23 (19-26)	27 (22-34)
Furcas	C	117 (93-134)	88 (75-98)	85 (72-104)	95 (86-106)
	L	20 (18-23)	-	-	12 (7-17)
Ocelos	C	6 (5-7)	7-8	5 (4-6)	8 (7-10)
	L	7 (5-9)	-	-	7 (7-10)

Tabela 8 – Comparação morfométrica da metacercária de *Clinostomum heluans* encontrado em *Australoheros* sp. e de *Clinostomum* spp. reportados por diferentes autores. C: Comprimento; L: Largura; D: Distância

	<i>Clinostomum heluans</i>		<i>C. detruncatum</i>	<i>C. marginatum</i>	<i>C. tataxumui</i>	<i>Clinostomum</i> sp.	
	Presente estudo	VICENTE et al., 1978 Brasil <i>Cichla temensis</i>	ACOSTA et al., 2016 Brasil <i>Synbranchus marmoratus</i>	SERENO.URIBE et al., 2013 México Diversos	SERENO-URIBE et al., 2013 México <i>Dormitator maculatus</i>	PINTO; MELO, 2015b <i>Poecilia reticulata</i> (Experimental) Musculatura Cabeça Nadadeiras	
Localidade							
2ºHospedeiro intermediário							
Sítio de infecção	Nadadeiras	-	-	-	Mesentério		
Corpo	C	2981 (2300-3192)	2000-2200	8435 (8022-9270)	3300 (2770-4100)	2940 (2390-3950)	4224 (3610-5553)
	L	582 (446-678)	640-740	3410 (3220-3695)	730 (600-850)	593 (340-840)	1215 (1031-1616)
Ventosa oral (VO)	C	177 (155-197)	120-150	382 (315-405)	183 (160-220)	160 (140-210)	213 (170-239)
	L	135 (113-141)	120-140	433 (421-441)	196 (170-220)	174 (150-210)	251 (232-273)
Ventosa ventral (VV)	C	333 (282-359)	200-420	1041 (1020-1072)	496 (430-620)	420 (250-560)	685 (602-746)
	L	348 (260-380)	230-290	1096 (1050-1149)	530 (450-620)	431 (320-570)	684 (602-756)
VO → VV	D	427 (352-465)	-	892 (763-1000)	539 (380-700)	468 (350-610)	659 (515-860)
Testículo anterior	C	56 (48-66)	56	498 (359-655)	224 (180-370)	171 (120-250)	159 (137-206)
	L	95 (78-131)	84-120	1113 (890-1266)	247 (200-350)	200 (140-275)	142 (137-226)
Testículo posterior	C	51 (38-64)	56	601 (528-708)	214 (170-270)	172 (115-230)	217 (178-259)
	L	100 (76-124)	84-120	1020 (802-1318)	280 (250-400)	230 (180-320)	172 (116-311)
Ovário	C	54 (47-66)	50-110	185 (157-205)	98 (80-120)	96 (72-130)	110 (89-147)
	L	30 (21-38)	90-150	131 (103-156)	73 (60-90)	70 (42-111)	85 (68-120)
Saco do cirro	C	122 (112-138)	-	649 (604-685)	200 (180-220)	179 (137-225)	183 (150-205)
	L	44 (38-48)	-	201 (180-226)	106 (90-120)	91 (65-125)	121 (89-164)

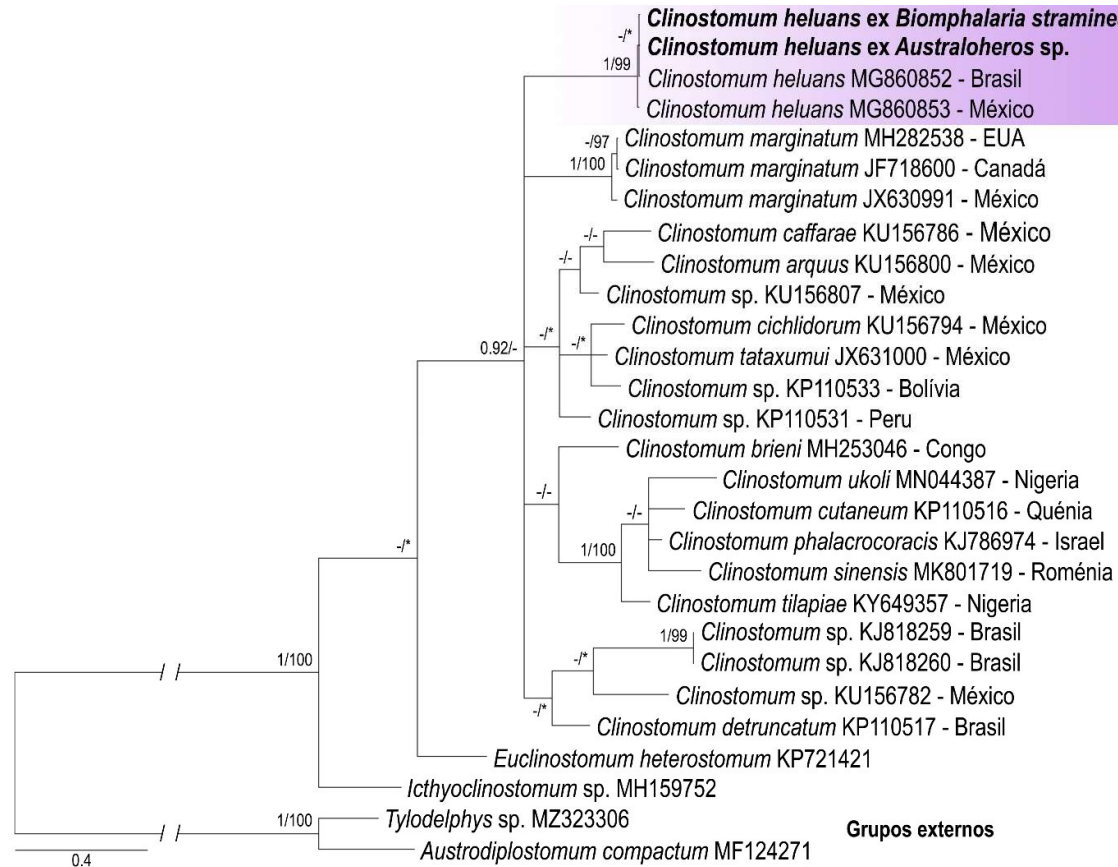


Figura 7 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança de representantes da família Clinostomidae, inferida através de *cox1* (306 bp, modelo evolutivo: HKY + G). Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. (\*) Asteriscos nos nós sinalizam diferenças na topologia recuperada por MV. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.

### 5.3.2 Superfamília Diplostomoidea Poirier, 1886

#### 5.3.2.1 Família Diplostomidae Poirier, 1886

##### 5.3.2.1.1 *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928)

Tipo cercariano: Estrigeocercária.

Primeiro hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,08% (4/4806).

Local de coleta: Ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 29/05/2018 (1,92%); 11/08/2018 (0,22%); 22/05/2019 (0,99%).

Segundo hospedeiro intermediário natural: *Oreochromis niloticus* (1/7, 14,3%), Poecilidae gen. sp. (1/40, 2,5%)

#### *Caracterização morfológica*

*Cercária* (n=15): larva com cauda bifurcada (Figura 8A). Corpo cercariano alongado, 156 (142–169) × 39 (34–45), com tegumento coberto de microespinhos na região anterior (Figura 8B). Presença de dois pares de glândulas de penetração pré-acetabulares. Órgão anterior subterminal, ovalado, 26 (25–29) × 20 (18–21). Pré-faringe curta, seguida de faringe muscular, 8 (7–9) de diâmetro. Esôfago curto que bifurcação na região anterior às glândulas de penetração. Os cecos intestinais alongados e sinuosos. Ventosa ventral pós-equatorial, 20 (20–21) × 22 (20–23), com uma fileira de 26 espinhos na abertura (Figura 8C). Furcas longas, 206 (196–218) × 16 (14–18). Tronco caudal, 181 (170–196) × 29 (25–34), com 5 pares de corpos caudais. São produzidas por esporocistos alongados (Figura 8D).

*Metacercária* (n=6): Tipo “Diplostomulum”. Corpo foliáceo, bipartido, 1697 (1551–1819) × 692 (642–713) (Figura 8E). Ventosa oral subterminal, 75 (69–81) × 69 (64–78). Par de pseudoventosas bem desenvolvidas, 99 (90–112) × 96 (86–112), situadas lateralmente à ventosa oral. Faringe, 80 (73–86) × 49 (45–55). Esôfago curto. Cecos intestinais simples, estendendo-se até o nível do primórdio genital. Ventosa ventral ausente. Órgão tribocítico alongado, 343 (310–373) × 144 (134–155). Primórdios das glândulas vitelínicas estendem-se entre o esôfago e órgão tribocítico, ocupando entre 45

e 55% do corpo. Primórdio genital presente, conformada por duas massas arredondadas, localizadas posteriormente ao órgão tribocítico. Segmento cônico posterior curto, 160 (125–214) × 190 (143–214). Na tabela 9 são comparados os dados da metacercária com as de *A. compactum* e *A. mordax* descritas por outros autores.

#### *Caracterização molecular*

A sequência parcial do marcador 28S (1224 bp) apresentou 100% de identidade com isolados de *A. compactum* obtidos no Brasil (ACHATZ et al., 2022), EUA (ROSSER et al., 2016) e México (SERENO-URIBE et al., 2019) como verificado através do BLAST. Posteriormente, foram executadas as análises filogenéticas incluindo diferentes isolados de *Austrodiplostomum* spp. e de espécies de outros gêneros da família Diplostomidae (*Diplostomum*, *Hysteromorpha* e *Tylodelphys*). A árvore obtida revelou que o parasito obtido forma parte de um clado bem suportado conformado por espécies do gênero *Austrodiplostomum* (Figura 9). Encontra-se inserido no clado da espécie *A. compactum*, contudo, com baixos valores de suportes. A divergência genética entre *A. compactum* e *A. mordax* Szidat & Nani, 1951 (SERENO-URIBE et al., 2019) foi de 1,1%. No caso da comparação com duas espécies que foram detectadas no México e que ainda não possuem descrição morfológica das formas adultas (SERENO-URIBE et al., 2019), *Austrodiplostomum* sp. 1 e *Austrodiplostomum* sp. 2, as divergências foram 0,4% e 0,3%, respectivamente. Para este marcador apenas está disponível a sequência de uma espécie *Austrodiplostomum* detectado fora do continente americano (Ucrânia) (ACHATZ et al., 2022), e a divergência genética com *A. compactum* foi de 0,2%.

*Comentários:* As características morfométricas da cercária estão de acordo com as obtidas por Pinto e Melo (2013b) na mesma espécie de molusco oriundo de Belo Horizonte, Minas Gerais. A identificação específica da larva como *A. compactum* foi possível com o auxílio do marcador ribossomal. No caso das metacercárias encontradas em *O. niloticus* e Poecilidae gen. sp., estas foram coletadas no globo ocular, diferentemente de *A. mordax* Szidat & Nani, 1951, cujas larvas localizam-se no cérebro (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2017). A identificação da metacercária foi exclusivamente pelas características morfológicas, distinguindo-se de *A. mordax* por apresentar um maior tamanho e possuir primórdio genital ocupando um menor espaço em relação ao corpo.



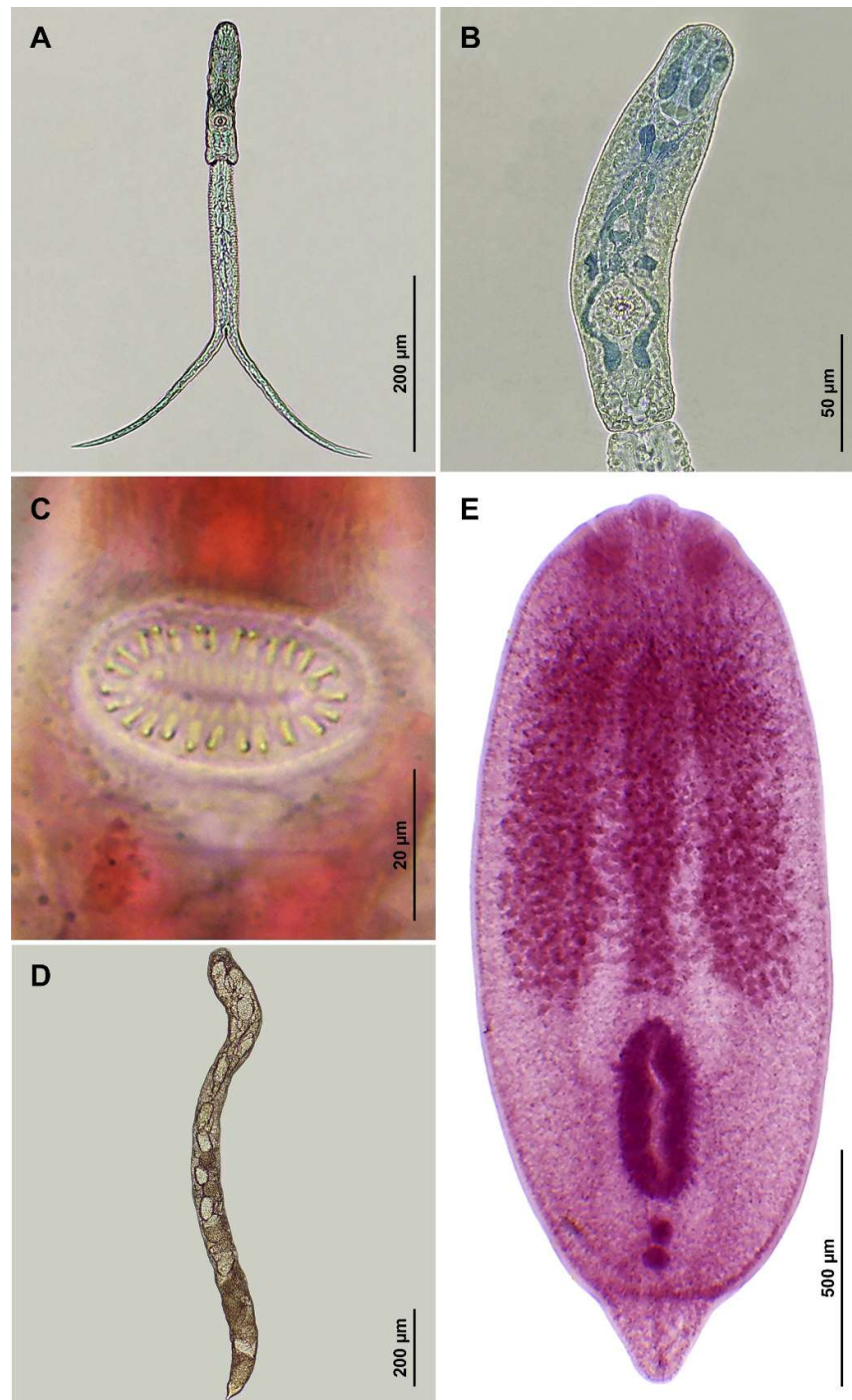


Figura 8 – *Austrodiplostomum compactum*. (A) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Detalhe do corpo cercariano corado por sulfato azul de Nilo. (C) Detalhe da ventosa ventral com microespinhos. (D) Esporocisto obtido em molusco infectado. (E) Metacercária corado com carmim obtida do globo ocular de um exemplar de *Australoheros* sp. procedente do ponto C.

Tabela 9 – Dados morfométricos de metacercárias de *Austrodiplostomum compactum* obtidas naturalmente em no presente estudo e de outros isolados da mesma espécie e de *A. mordax* reportados por diferentes autores. C: Comprimento; L: Largura; \*: Informação obtida por OSTROWSKI DE NÚÑEZ (2017)

	<i>Austrodiplostomum compactum</i>				<i>Austrodiplostomum mordax</i>
	Presente estudo	PINTO; MELO, 2013	GARCÍA-VARELA et al., 2016	OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2017	OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2017
Localidade		Brasil	México	Venezuela	Argentina
Hospedeiro	<i>Oreochromis niloticus</i>		<i>Rhamdia guatemalensis</i>	<i>Geophagus</i> sp.	<i>Odontheistes bonariensis</i>
Sítio de infecção	Olho	Olho	Olho	Olho	Cérebro
Corpo	C 1697 (1551-1819) L 692 (642-713)	1469 (1116-2232) 722 (481-1288)	1400 (1300-1500) 540 (480-610)	1429 (1280-1537) 619 (512-720)	1056 (864-1216) 339 (304-432)
Ventosa oral	C 75 (69-81) L 69 (64-78)	58 (47-95) 68 (53-107)	72 (62-82) 66 (50-75)	71 (64-77) 67 (61-74)	58 (48-67) 62 (58-67)
Faringe	C 80 (73-86) L 49 (45-55)	71 (50-108) 50 (35-75)	64 (52-75) 53 (42-60)	57 (48-64) 47 (42-48)	49 (38-64) 41 (35-48)
Órgão tribocítico	C 343 (310-373) L 144 (134-155)	337 (246-444) 229 (164-321)	270 (200-300) 115 (100-130)	336 (288-384) 170 (144-224)	208 (192-224) 117 (96-144)
Primórdio genital/Corpo	% 6 (5-6)	-	8,1*	6 (4,1-7,3)	13 (12-14)

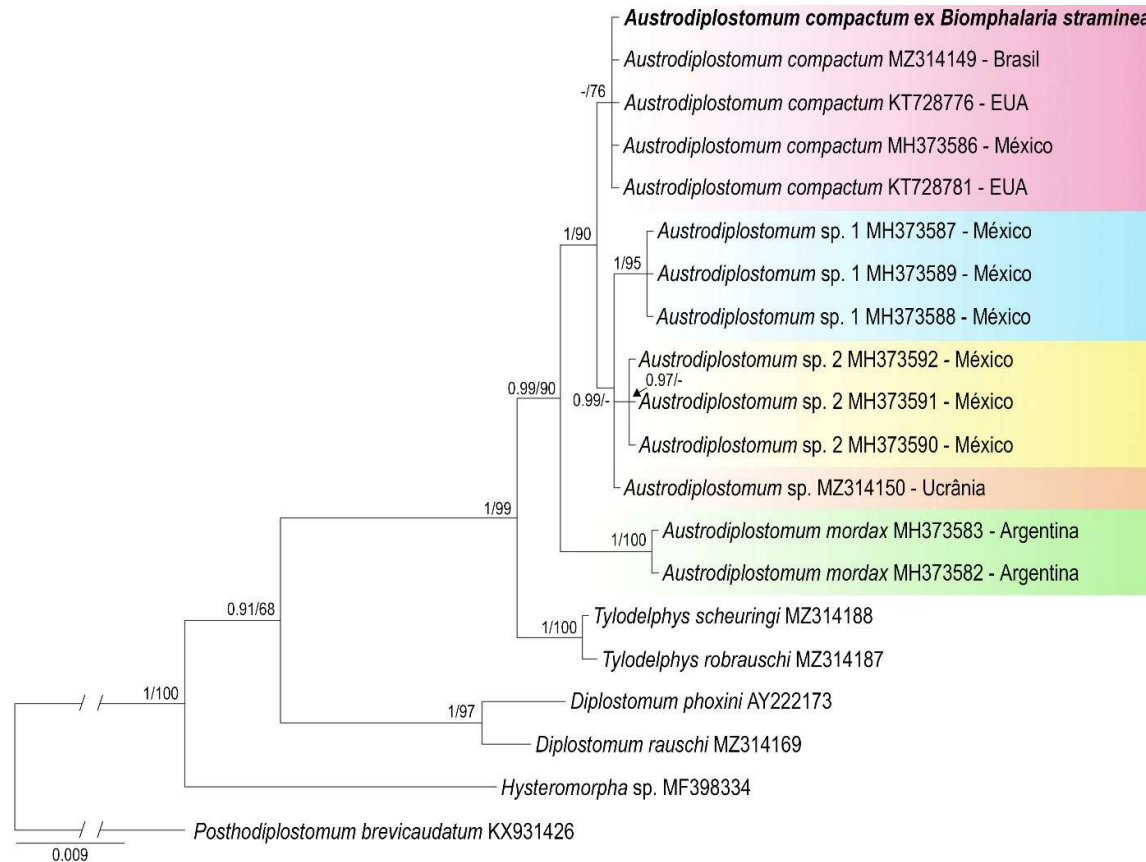


Figura 9 –Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança (1141 pb, modelo evolutivo HKY + G) de representantes da subfamília Diplostominae, inferida através do marcador 28S. Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.

### 5.3.2.1.2 *Hysteromorpha* sp.

Tipo cercariano: Estrigeocercária.

Primeiro hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,12% (6/4806).

Local de coleta: Ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 11/09/2018 (0,22%); 13/09/2018 (0,40%); 19/06/2019 (2,04%); 20/07/2019 (0,41%).

#### *Caracterização morfológica*

*Cercária* (n=20): Larva com cauda bifurcada (Figura 10A). Corpo cercarianos alongado, 177 (159–192) × 43 (38–47) (Figura 10B). Tegumento com fileiras transversais de microespinhos na área corresponde ao órgão anterior. Presença de dois pares de glândulas de penetração proeminentes com conteúdo granular, um par pré-acetabular e outro para-acetabular. Pré-faringe curta, faringe muscular, 11 (10–12) de diâmetro, seguida de esôfago curto. Bifurcação dos cecos intestinais anterior as glândulas de penetração. Cecos alongados, terminando antes da vesícula excretora. Ventosa ventral pós-equatorial, arredondada, 18 (16–21) × 19 (16–21). Tronco caudal, 248 (228–252) × 36 (31–43), desprovido de corpos caudais. Furcas longas, 241 (228–252) × 19 (17–24). Na tabela 10 são apresentados os dados da larva e de outras semelhantes descritas no continente americano.

#### *Caracterização molecular*

A região que compreende ITS1-5.8S-ITS2 foi obtida para esta larva (1277 bp). Através da comparação com sequências disponíveis no GenBank, foi evidenciado que esta apresentou 100% de similaridade com isolados de *Hysteromorpha corti* (Hughes, 1929) (JF769486, HM064925-26, MG649485-92) e *Hysteromorpha* sp. (MN179274-26) reportadas no México e Brasil, respectivamente (SERENO-URIBE et al., 2018; LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019). A divergência genética com a espécie tipo do gênero, *Hysteromorpha triloba* (Rudolphi, 1819) (MH521250), foi extremamente baixa (0,1%) (LOCKE et al., 2018).

*Comentários:* As características morfométricas estão de acordo com a descrição de *Hysteromorpha* sp. feita por Pinto (2013) e López-Hernández et al. (2019) no Brasil,

apesar de variações do órgão anterior e ventosa ventral no último trabalho. Em ambos os estudos, *B. straminea* foi reportado como primeiro hospedeiro intermediário. Não foram evidenciadas diferenças morfométricas quando comparado com a cercária de *H. corti* (HUGGHINS, 1974). É provável que o isolado do presente estudo seja coespecífico com os isolados previamente reportados no Brasil, o que poderá ser confirmado no futuro com a obtenção de sequências *cox1*.

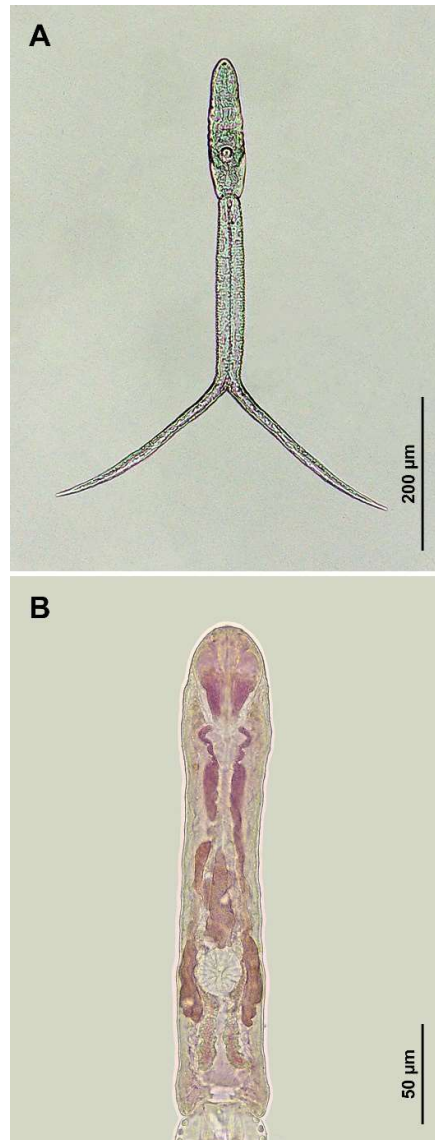


Figura 10 – *Hysteromorpha* sp. (A) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada por sulfato azul do Nilo. (B) Corpo cercariano corado com vermelho neutro.

Tabela 10 – Dados morfométricos de cercária de *Hysteromorpha* sp. no presente estudo e outras espécies do gênero reportados por diferentes autores. C: Comprimento; L: Largura

		<i>Hysteromorpha</i> sp.			<i>H. corti</i>
		Presente estudo	PINTO, 2013	LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019	HUGGHINS, 1954
Localidade			Brasil	Brasil	EUA
1° hospedeiro intermediário		<i>Biomphalaria straminea</i>	<i>B. straminea</i>	<i>B. straminea</i>	<i>Gyraulus deflectus</i>
Corpo	C	177 (159-192)	175 (143-205)	187 (137-206)	196 (168-221)
	L	43 (38-47)	44 (37-53)	51 (34-69)	45 (41-50)
Órgão anterior	C	41 (35-45)	46 (33-58)	32 (14-41)	50 (42-53)
	L	26 (24-31)	26 (23-28)	27 (21-34)	24 (20-28)
Faringe	C	11 (10-12)	12 (12-13)	-	13d (11-14)
	L	11 (10-12)	12	-	-
Ventosa ventral	C	18 (16-21)	18 (17-20)	30 (27-41)	18d (17-20)
	L	19 (16-21)	18 (15-23)	28 (21-41)	-
Tronco caudal	C	248 (228-259)	236 (205-266)	231 (192-274)	237 (226-260)
	L	36 (31-43)	38 (33-47)	37 (27-48)	36 (28-42)
Furcas	C	241 (228-252)	213 (184-239)	221 (205-267)	216 (196-227)
	L	19 (17-24)	22 (17-27)	16 (14-27)	14

### 5.3.2.1.3 *Tylodelphys* sp.

Tipo cercariano: Estrigeocercária.

Primeiro hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,02% (1/4806).

Local de coleta: ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 28/05/2018 (2%).

Segundo hospedeiro intermediário: *Poecilia reticulata* (Experimental).

Sítio de infecção: Cavidade abdominal.

*Estudo experimental:* 12 exemplares de *P. reticulata* foram expostos à solução de cercárias. Aos 14 DPI, foi realizada a necropsia de um peixe infectado, sendo detectada a presença de metacercárias na cavidade abdominal. Posteriormente, a forma parasitária foi recuperada nos demais exemplares aos 21 DPI.

#### *Caracterização morfológica*

*Cercária* (n=20): Larva com cauda bifurcada (Figura 11A). Corpo cercariano alongado, 139 (131–147) × 34 (33–36) (Figura 11B), com tegumento coberto por microespinhos, distribuídos densamente ao nível do órgão anterior. Presença de dois pares de glândulas de penetração localizados entre a bifurcação dos cecos intestinais e a ventosa ventral. Órgão anterior ovalado, 24 (22–26) × 19 (17–21). Pré-faringe curta. Faringe oval, 7 × 7 (7–9), seguida de esôfago curto. Ventosa ventral arredondada, 17 (16–19) de diâmetro, com uma fileira de 27 espinhos ao redor da abertura (Figura 11C). Os cecos intestinais não atingem a vesícula excretora. Tronco caudal, 210 (201–221) × 25 (24–28), com um par de corpos caudais. Furcas maiores que o tronco, 221 (211–235) × 15 (14–17). São produzidas por esporocisto alongados (Figura 11D). Na tabela 11 são apresentados os dados da larva e de outras semelhantes descritas por outros autores.

*Metacercária* (n=11) (Figura 11E, F): Tipo “Diplostomulum”. Espécimes *in vivo* apresentavam grânulos de inclusão ovalados. Corpo linguiforme, 636 (570–704) × 183 (155–204), levemente côncavo na face ventral. Extremidade anterior arredondada. Segmento posterior (*Hindbody*) com uma proeminência cônica. Ventosa oral subterminal, 48 (40–54) × 46 (33–52). Presença de um par de pseudoventosas, pouco diferenciadas, situadas lateralmente a ventosa oral. Faringe oval, 25 (21–29) × 18 (16–22), seguida de



esôfago, 23 (17–28) de largura. Cecos intestinais longos e lisos, terminando posteriormente ao órgão tribocítico. Ventosa ventral arredondada, 29 (24–33) × 33 (22–36), localizada na metade do corpo. Órgão tribocítico muscular, elíptico, 70 (59–80) × 45 (35–52), posterior a ventosa ventral. Primórdio genital situado posterior ao órgão tribocítico. Na tabela 12 são apresentadas as comparações morfométricas da metacercária com as de *Tylodelphys* spp. descritas por outros autores.

#### *Caracterização molecular*

Um fragmento do gene 28S (995 bp) foi obtido para esta cercária. As análises filogenéticas, que incluíram membros da subfamília Diplostominae (*Austrodiplostomum*, *Diplostomum*, *Dolichorchis*, *Hysteromorpha* e *Sphincterodiplostomum*, *Tylodelphys*) revelaram que o parasito avaliado neste estudo se encontra inserido num clado com representantes do gênero *Tylodelphys* Diesing, 1850 (Figura 12), mas com valores de suporte baixos (probabilidade posterior = 0,82; *bootstrap* = 61). O isolado deste estudo agrupou-se em um subclado com *Tylodelphys* cf. *americana* (diferença genética de 0,2%) (ACHATZ et al., 2022). Adicionalmente, o clado formado pelo presente parasito e *Tylodelphys* cf. *americana* é grupo irmão de uma espécie identificada como Diplostomidae sp. 1 (= *Tylodelphys* sp.), transmitida por *Biomphalaria havanensis* nos Estados Unidos (ROSSER, 2016). A divergência genética entre *Tylodelphys* sp. e Diplostomidae sp. 1 foi de 0,6%. Já as espécies do gênero detectados no México (*T. azteca*) e Estados Unidos (*T. conifera*, *T. immer*, *T. robrauschi*, *T. scheuringi*) (ACHATZ et al., 2022), formaram um clado com bom suporte, com maiores valores de divergência genética (1,2% e 1,8%), em relação a *Tylodelphys* sp. Tentativas na obtenção de sequências *cox1* (primers Plat-diploCOX1dF/Plat-diploCOX1dR, Dice1F/Dice1R) foram realizadas, porém, sem sucesso.

*Comentários:* A presença de dois pares de glândulas de penetração anterior à ventosa ventral na cercária obtida no presente estudo está de acordo com o reportado para larvas dos membros do gênero *Tylodelphys* como reportado por outros autores (NIEWIADOMKSA, 1960; OSTROWSKI DE NÚÑEZ; QUAGGIOTTO, 1995; FALTÝNKOVÁ et al., 2008) A cercária de *Austrodiplostomum compactum* também se caracteriza pela mesma disposição das glândulas de penetração (pré-acetabulares), contudo a relação do corpo cercariano e o tronco caudal de *Tylodelphys* sp. é menor (0,62-0,73 vs 0,82-0,94). Por outro lado, a cercária do presente estudo distingue-se de

*Tylodelphys* sp. detectado em *Chilina* sp. na Argentina (OSTROWSKI DE NÚÑEZ; QUAGGIOTTO, 1995), por possuir dados morfométricos menores. Já a cercária de Diplostomidae sp. 1 detectada em *B. havanensis* nos EUA (ROSSER, 2016) apresenta corpo cercariano maior, porém, o tronco caudal e furcas são menores. No entanto, ressalta-se que ditas variações devem-se ao método de fixação (diretamente em álcool 70°).

As metacercárias obtidas experimentalmente no presente estudo apresenta morfologia compatível com as descrições gerais de representantes do gênero *Tylodelphys*: corpo linguiforme, segmento posterior cônico e presença de pseudoventosas (NIEWIADOMSKA, 2002a). Uma metacercária também identificada como *Tylodelphys* sp. foi reportada em *Hoplias malabaricus* no estado de São Paulo (PELEGRINI et al., 2019), a qual apresentam a maior parte das medidas semelhantes às obtidas no presente estudo. A possibilidades destes isolados serem coespecíficos não pode ser descartada, demandando novos estudos moleculares.

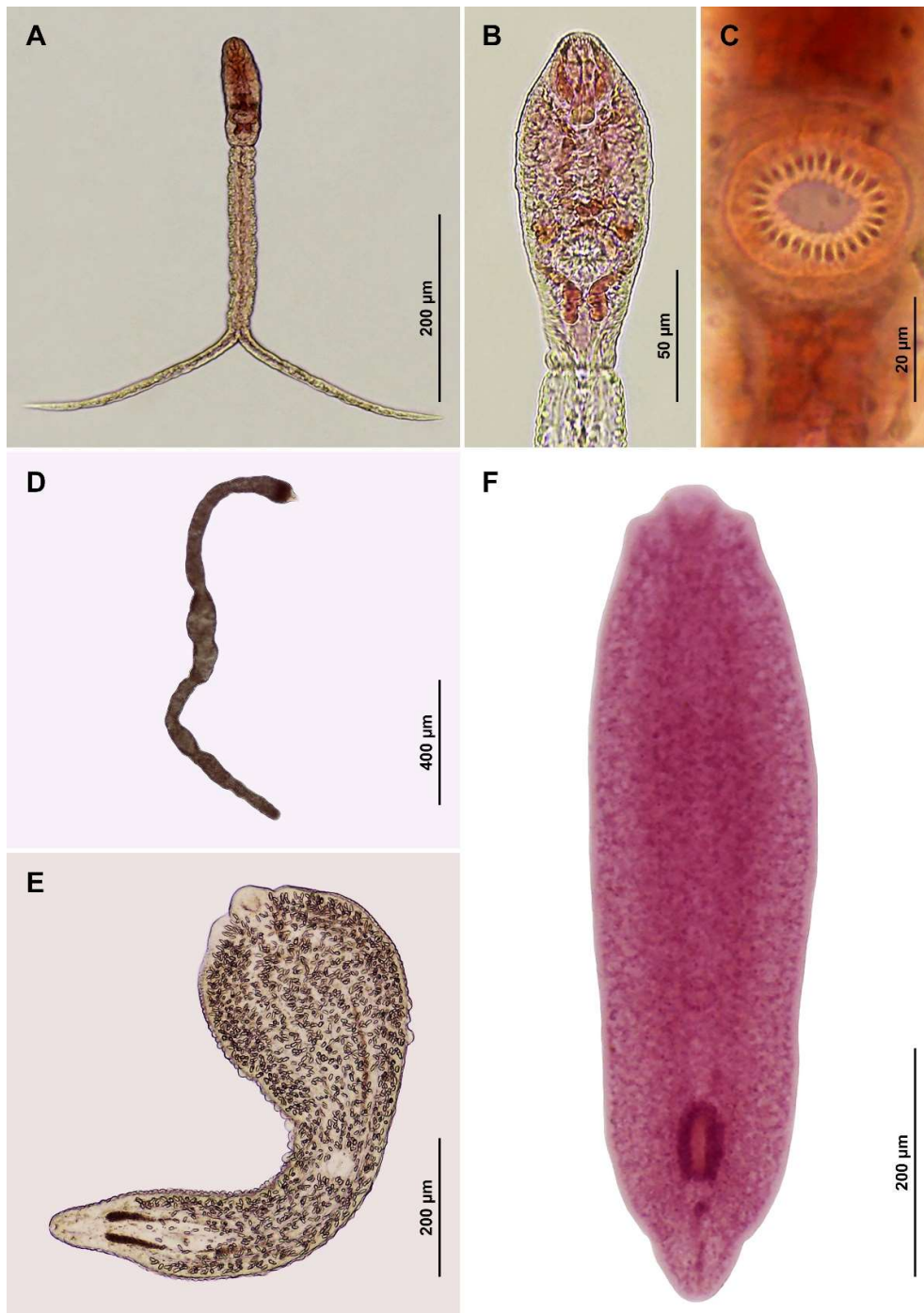


Figura 11 – *Tylodephys* sp. (A) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Região anterior corada pelo vermelho neutro. (C) Detalhe da ventosa ventral com espinhos. (D) Esporocisto obtido de molusco infectado. Metacercária obtida experimentalmente em *Poecilia reticulata* após 21 dias de infecção, (E) *in vivo* e (F) corado pelo carmim.

Tabela 11 – Dados morfométricos da cercária de *Tylodelphys* sp. obtida no presente estudo e de outras espécies do gênero reportados por diferentes autores no continente americano, incluindo os dados de *Austrodiplostomum compactum*. C: Comprimento; L: Largura. \* Dado obtido do trabalho de Ostrowski de Núñez e Quaggiotto (1995).

		<i>Tylodelphys</i> sp.	Furcocercaria sp. A (cf. <i>Tylodelphys</i> )	Diplostomidae sp.1 ( <i>Tylodelphys</i> sp.)	<i>Austrodiplostomum compactum</i>
		Presente estudo	OSTROWSKI DE NÚÑEZ; QUAGGIOTTO, 1995	ROSSER et al., 2016	Presente estudo
Localidade			Argentina	EUA	
1° hospedeiro intermediário		<i>Biomphalaria straminea</i>	<i>Chilina</i> sp.	<i>Biomphalaria havanensis</i>	<i>B. straminea</i>
Corpo	C	139 (131-147)	206 (189-231)	189 (175-207)	157 (142-169)
	L	34 (33-36)	43,9 (39-52)	37 (33-43)	39 (34-45)
Ventosa oral	C	24 (22-26)	50,7 (42-55)	-	26 (25-29)
	L	19 (17-21)	22,9 (21-26)	-	20 (18-21)
Faringe	C	7	-	-	8 (7-9)
	L	7 (7-9)	-	-	8 (7-9)
Ventosa ventral	C	17 (16-19)	22,6 (21-23)	20 (18-22)	20 (20-21)
	L	17 (16-19)	23,5 (21-26)	20 (17-22)	22 (20-23)
Tronco caudal	C	210 (201-221)	266,4 (231-284)	165 (152-180)	181 (170-196)
	L	25 (24-28)	32,2 (26-42)	29 (27-35)	29 (25-34)
Furcas	C	221 (211-235)	231,1 (179-252)	175 (168-181)	206 (196-218)
	L	15 (14-17)	-	16 (14-17)	16 (14-18)
Corpo/Tronco caudal		0,66 (0,62-0,73)	0,77*	-	0,87 (0,82-0,94)

Tabela 12 – Dados morfométricos de metacercária de *Tylodelphys* sp. obtida experimentalmente no presente estudo e de metacercárias do mesmo gênero encontradas na cavidade visceral de peixes no continente americano. C: Comprimento; L: Largura.

		<i>Tylodelphys</i> sp.	<i>Tylodelphys azteca</i>	<i>Tylodelphys</i> sp.
		Presente estudo	GARCÍA-VARELA et al., 2016	PELEGRINI et al., 2019
2° hospedeiro intermediário		<i>Poecilia reticulata</i> (Experimental)	<i>Goodea atripinnis</i>	<i>Hoplias malabaricus</i>
Sítio de infecção		Cavidade visceral	Cavidade visceral	Cavidade visceral
Corpo	C	636 (570-704)	1230 (940-1530)	684 (551-1033)
	L	183 (155-204)	444 (290-590)	151 (91-195)
Ventosa oral	C	48 (40-54)	55 (40-80)	33 (11-54)
	L	46 (33-52)	45 (30-72)	32 (15-56)
Faringe	C	25 (21-29)	32 (22-60)	25 (23-28)
	L	18 (16-22)	17 (12-22)	30 (24-37)
Ventosa ventral	C	29 (24-33)	83 (45-157)	36 (21-66)
	L	33 (22-36)	64 (37-90)	10 (17-53)
Órgão tribocítico	C	70 (59-80)	207 (170-245)	47 (30-65)
	L	45 (35-52)	88 (67-140)	93 (71-145)

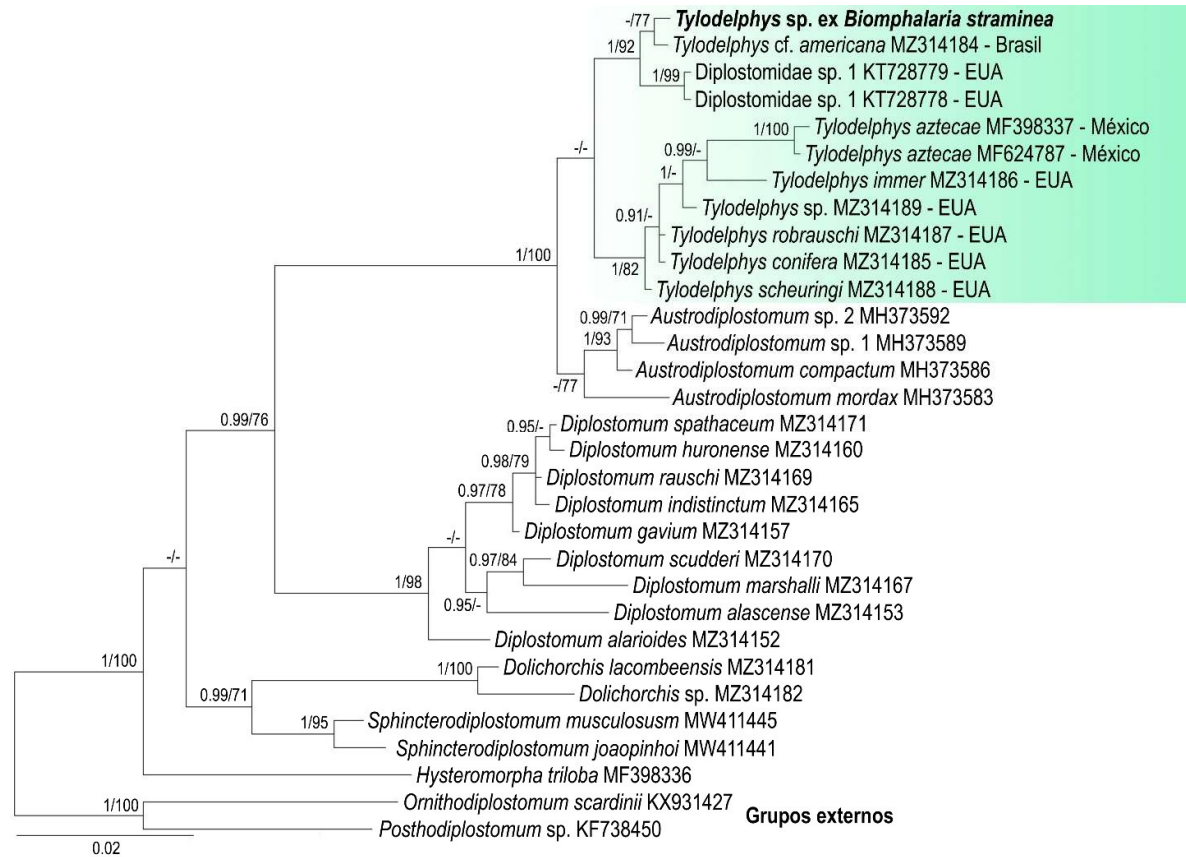


Figura 12 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança (996 bp, modelo HKY + G) de diplostomídeos, inferida através do marcador 28S. Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.

### 5.3.2.2 Família Strigeidae Railliet, 1919

#### 5.3.2.2.1 *Cotylurus* sp.

Tipo cercariano: Estrigeocercária.

Primeiro hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,21% (10/4806).

Local de coleta: Ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 20/08/2019 (1,19%); 21/08/19 (3,02%).

Segundo hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Sítio de infecção: Intramolusco

#### *Caracterização morfológica*

*Cercária* (n=3): Larva com cauda bifurcada (Figura 13A). Corpo (Figura 13B), 125 (121–128) × 34 (29–36), com tegumento espinhoso, mais densos na região anterior. Presença de dois pares de glândulas de penetração anteriores à ventosa ventral. Órgão anterior ovalado, 33 (31–26) × 18 (17–21). Pré-faringe curta. Faringe oval, 7 (7–9) de diâmetro, seguida de esôfago curto. Ventosa ventral esférica, 21 (21–22) × 20 (19–22), pós-equatorial, com presença de espinhos finos ao redor da abertura (Figura 13C). Os cecos intestinais são alongados e não atingem a vesícula excretora. As cercárias são produzidas por esporocistos alongados (Figura 13D).

*Metacercária* (n=20): Tipo “Tetracotyle” (Figura 13E). Formato piriforme, 319 (296–352) × 262 (232–296). Parede cística hialina, observada *in vivo*. O parasito foi recuperado após esmagamento do molusco.

Na tabela 13 são comparados os dados dos estágios larvais e de outras semelhantes descritas por outros autores.

#### *Caracterização molecular*

Foi obtido um fragmento de 563 bp do gene *cox1* (região *barcode*) a partir da análise desta cercária. A sequência foi comparada com outras disponíveis para espécies dos gêneros *Cotylurus* Szidat, 1928 e *Ichthyocotylurus* Odening, 1969. Foi observado que o isolado deste estudo se encontra inserido um clado bem suportado com espécies de

*Cotylurus* (Figura 14). Além disso, verificou-se que forma um subclado com um isolado de *Cotylurus* sp. reportado na cidade de Belo Horizonte (LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019), cuja diferença genética foi de 1,7%, revelando coespecificidade. As divergências genéticas com relação a *Cotylurus* spp. reportadas no Canadá (LOCKE et al., 2018) e Japão (NAKAO; SASAKI, 2021) foram maiores, variando entre 9,7% e 11%. A diferença entre *Cotylurus* sp. e as espécies do gênero *Ichthyocotylurus* foi de 14–16%.

*Comentários:* A morfologia da cercária e metacercária detectadas em *B. straminea* estão de acordo com o descrito para representantes do gênero *Cotylurus*, incluindo a presença de dois pares de glândulas de penetração anteriores à ventosa ventral (NIEWIADOMSKA, 2002b). Os dados moleculares revelam que se trata de *Cotylurus* sp., previamente reportada em Belo Horizonte (LOPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2018), com dados morfométricos semelhantes. Esta cercária foi previamente descrita como *Cercaria caratinguensis* por Ruiz (1953), que descreve a posição das glândulas como sendo pós-acetabular. Contudo, este mesmo autor salienta as dificuldades na caracterização da disposição das glândulas de penetração desta cercária. No presente estudo, a posição preacetabular destas glândulas pode ser demonstrada de maneira inequívoca. A análise molecular também permitiu a diferenciação de outras espécies relatadas no Brasil, como *C. cornutus* (Rudolphi, 1808) e *C. gallinulae* Lutz, 1928 (FERNANDES et al., 2015). Adicionalmente, a cercária do presente estudo diferencia-se de *C. flabelliformis* (Faust, 1917), reportada nos Estados Unidos (OLIVIER; CORT, 1941), por apresentar menores dimensões nas estruturas. Recentemente, na Argentina, foram descritos em *B. straminea* estágios larvais de *Cotylurus* sp. (FERNÁNDEZ; HAMANN, 2017), porém, a cercária apresenta um maior tronco caudal e furcas, e uma menor metacercária, quando comparada com a do presente estudo.



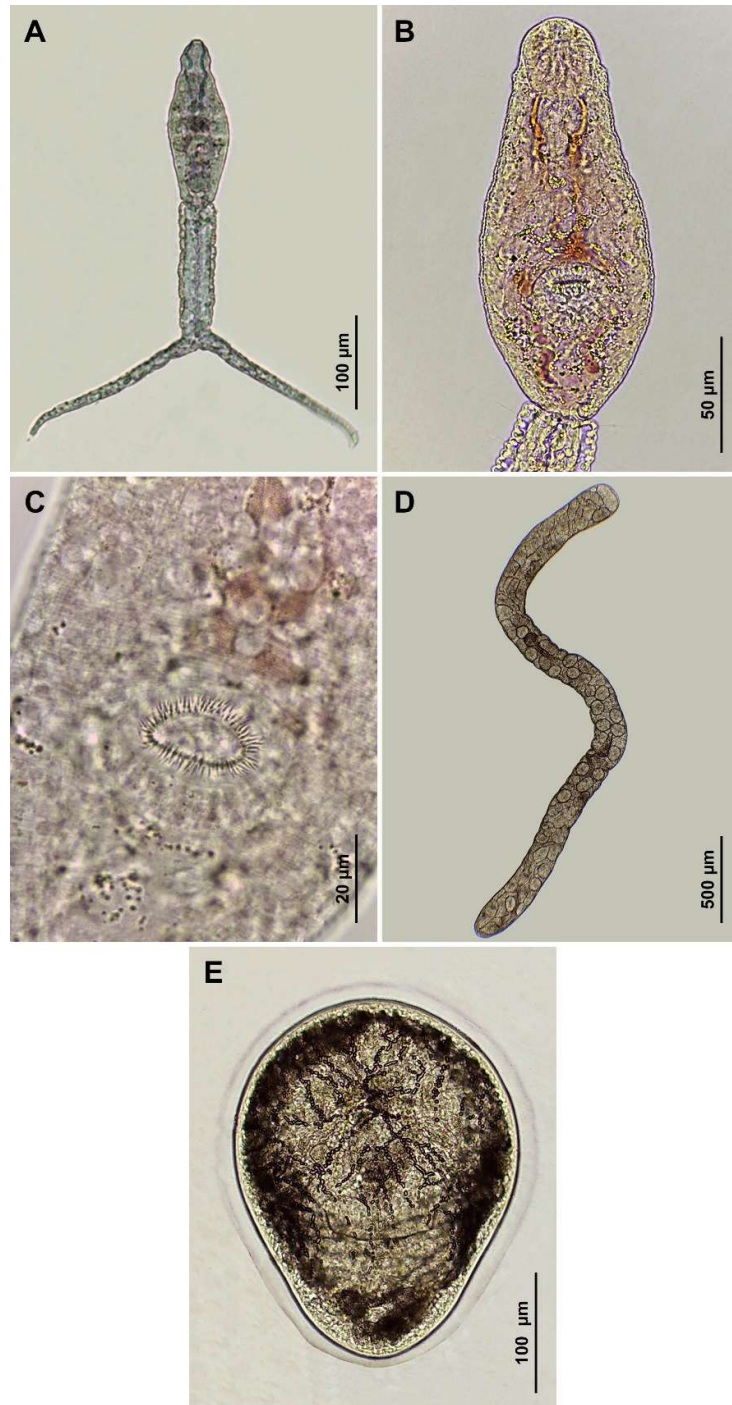


Figura 13 – *Cotylurus* sp. (A) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano corado com sulfato azul do Nilo. (C) Detalhe da ventosa ventral. (D) Esporocisto recuperado de molusco infectado. (E) Metacercária encistada *in vivo*.

Tabela 13 – Dados morfométricos de cercária e metacercária de *Cotylurus* sp. obtidos no presente estudo e de larvas semelhantes descritas por outros autores no continente americano. C: Comprimento; L: Largura; d: diâmetro.

	<i>Cotylurus</i> sp.		<i>C. flabelliformis</i>	<i>C. lutzi</i>	Furcocercaria V
	Presente estudo	LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019 Brasil	OLIVIER; CORT, 1941 EUA	BASCH, 1969 Brasil	FERNÁNDEZ; HAMANN, 2017 Argentina
Localidade 1º hospedeiro intermediário	<i>Biomphalaria straminea</i>	<i>B. straminea</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>B. glabrata</i>	<i>B. straminea</i>
Corpo	C 180 (175-185) L 54 (54-55)	172 (158-185) 48 (34-62)	217 (185-250) 39 (32-51)	151 (130-174) 34 (31-49)	155 (120-195) 56 (46-96)
Órgão anterior	C 35 (33-38) L 25 (24-26)	32 (21-41) 24 (14-34)	40 (32-47) 20 (18-23)	31 (26-34) 23 (21-26)	38 (32-44) 31 (25-39)
Faringe	C 13 (12-14) L 9 (9-10)	- -	- -	- -	14 (11-16) 14 (14-16)
Ventosa ventral	C 25 (24-26) L 24	32 (21-43) 30 (21-43)	24 (21-26)d -	30 (22-31)d -	25 (20-30) 26 (23-30)
Tronco caudal	C 160 (156-164) L 33 (29-36)	193 (165-247) 41 (34-48)	238 (211-256) 36 (32-45)	156 (115-166) 32 (29-39)	209 (140-235) 43 (32-55)
Furcas	C 182 (176-185) L 16 (16-17)	213 (185-226) 15 (14-21)	239 (211-262) -	160 (143-174) 15 (13-16)	204 (154-230) 27 (20-34)
<i>Metacercária</i>	C 319 (296-352) L 262 (232-296)	302 (279-329) 255 (237-277)	- -	220-240 160-200	195 (180-210) 139 (135-165)

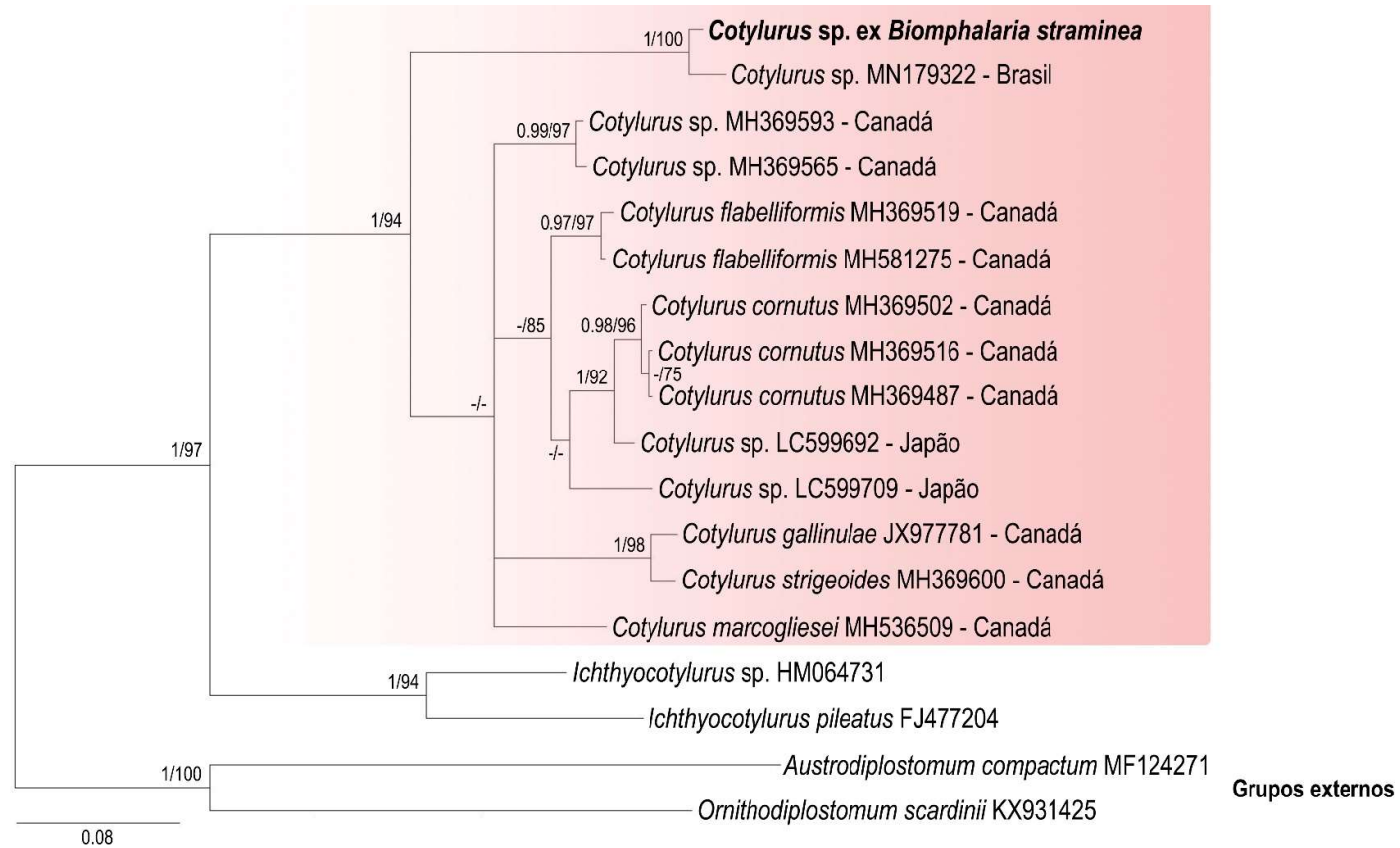


Figura 14 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança (462 bp, modelo evolutivo GTR + G) espécies do gênero *Cotylurus*, inferida através do marcador *cox1*. Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.

### 5.3.2.2.2 *Parastrigea* sp.

Tipo cercariano: Estrigeocercária.

Primeiro hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,37% (18/4806).

Local de coleta: Ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 07/10/2017 (1,37%); 30/07/2018 (0,23%); 20/08/2019 (2,98%); 21/08/2019 (4,15%).

Segundo hospedeiro intermediário: Girinos de *Rhinella* sp. (78/78, 100%).

Sítio de infecção: Cavidade visceral.

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=20): Larva com cauda bifurcada (Figura 15A). Corpo cercariano alongado, 163 (149–173) × 48 (43–54). Presença de microespinhos ao nível do órgão anterior (Figura 13C). Presença de oito pares de glândulas de penetração: um par pré-acetabular, três para-acetabulares, e os restantes, pós-acetabulares (Figura 15B). Pré-faringe curta, faringe ovalada, 9 × 8 (7–9), esôfago curto. Ventosa ventral esférica, 21 (19–22) × 22 (19–22), post-equatorial, com presença de microespinhos finos na abertura (Figura 15D). Ocelos sem pigmentação, anteriores à ventosa ventral. Tronco caudal, 153 (142–168) × 39 (33–45), com dois pares de corpos caudais. Furcas maiores que o tronco, 171 (161–183) × 13 (12–14). Cercárias formadas por esporocistos (Figura 15E). Na tabela 14 são comparadas as medidas com as de uma larva semelhante relatada na Argentina (FERNÁNDEZ; HAMANN, 2017).

Metacercária (n=20): Tipo “Tetracotyle” (Figura 15F). Formato ovalado, 406 (359–444) × 228 (197–253), com parede cística espessa.

#### *Caracterização molecular*

Foram obtidas sequências de ITS1-5.8S-ITS2 da cercária (1263 bp) e metacercária (1262 bp). Foi construído um alinhamento com sequências disponíveis de *Parastrigea* spp. e outros membros da família Strigeidae (*Apharyngostrigea*, *Australapatemon*, *Apatemon*, *Cotylurus* e *Cardiocephaloides*). Na árvore filogenética obtida (Figura 16A), observou-se que os isolados formam um subclado, formando parte do clado constituído por espécies do gênero *Parastrigea* Szidat, 1928 reportadas no México (HERNÁNDEZ-MENA et al.,

2014), com alto suporte nodal. Foi detectada uma diferença molecular de 0,2% entre os parasitos recuperados de *Rhinella* sp. e *B. straminea*. Evidenciou-se que ambos os isolados têm uma relação próxima com *P. plataleae*, com uma divergência genética variando entre 0,1% e 0,4%. A diferença genética com *P. cincta* Szidat, 1928 e *P. diovadana* Dubois & Macko, 1972 foram 0,9-1,2% e 1,2-1,6%, respectivamente. Foi observada variação intraespecífica em *P. plataleae* Hernández-Mena et al., 2014 (0,1%) e *P. diovadana* (0,3%). Além disso, foi calculada a variação interespecífica: *P. cincta* vs *P. diovadana*, 0,5-0,8%; *P. cincta* vs *P. plataleae*, 0,8-0,9%; *P. diovadana* vs. *P. plataleae*, 1,1-1,3%.

Sequência parcial de *cox1* (599 bp) foi amplificada apenas para a forma parasitária encontrada no molusco e alinhada com as de espécies do gênero *Parastrigea*. Na reconstrução filogenética (Figura 16B) foi observado que o parasito é táxon irmão de *P. plataleae*, porém, com suporte baixo. A divergência molecular de ambos parasitos foi 8,1-8,7%. Quando comparada com *P. cincta* e *P. diovadana*, os valores foram 11% e 11-12%.

*Comentários:* A análise filogenética permitiu identificar a *B. straminea* e *Rhinella* sp. como o primeiro e segundo hospedeiro intermediário de *Parastrigea* sp, respectivamente. Morfológicamente, a cercária é semelhante com a descrita por Fernández e Hamann (2017) pelo número de glândulas de penetração e presença de ocelos sem pigmentação, porém, com maiores medidas em relação ao corpo cercariano, tronco caudal e furcas. Ressalta-se que os representantes do gênero *Parastrigea* têm como segundo hospedeiro intermediário anuros (NIEWIADOMSKA, 2002b), dando suporte a presente identificação. Baseado nos dados moleculares, a diferença observada entre as sequências de ITS de ambos os isolados obtidos no presente estudo, pode-se tratar de uma variação intraespecífica, como observado no caso de *P. diovadana*. No caso do marcador mitocondrial, as divergências moleculares detectadas, indicam que o presente parasito é diferente de *P. plataleae*.

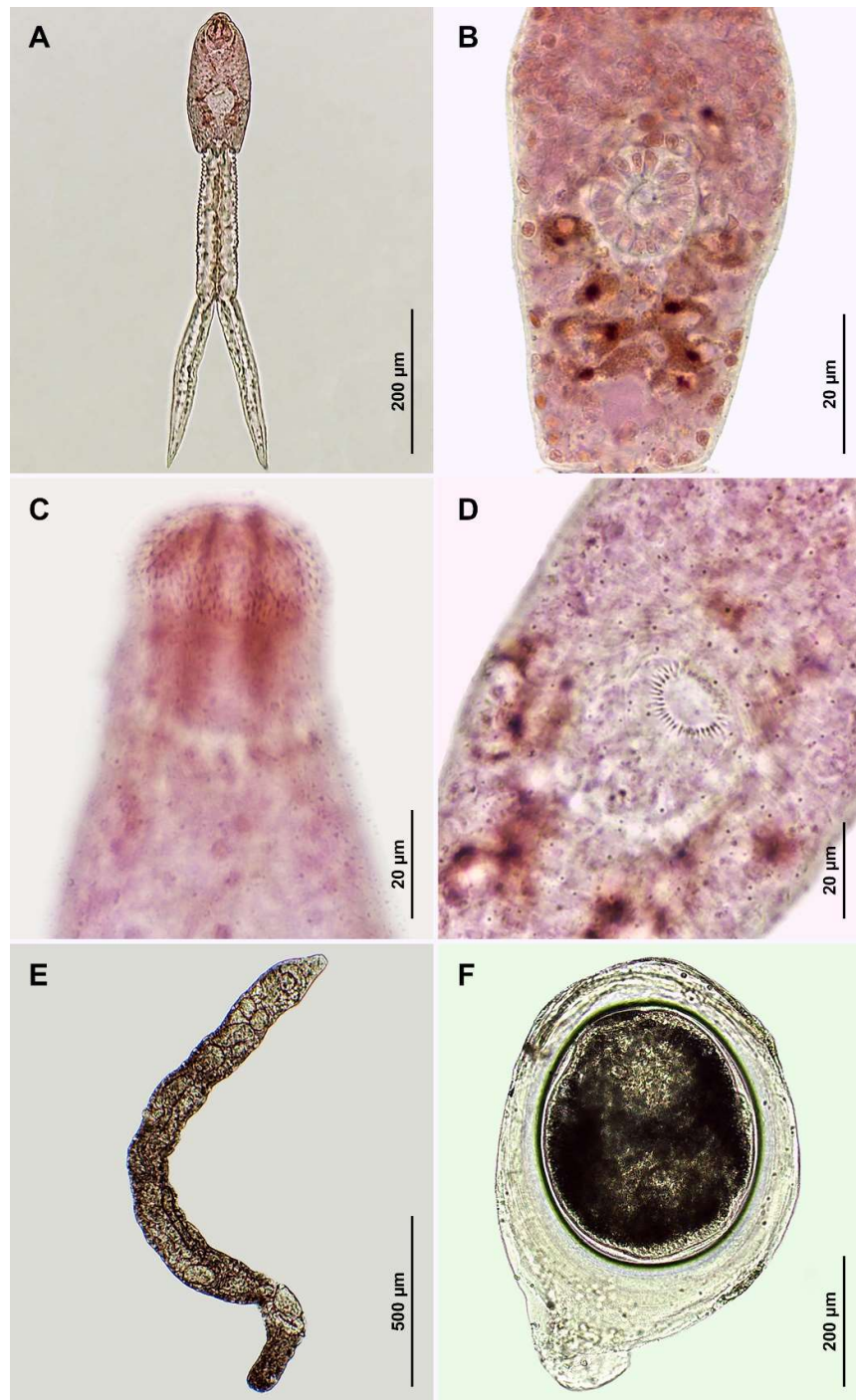


Figura 15 – *Parastrigea* sp. (A) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Detalhe das glândulas de penetração. (C) Detalhe do tegumento espinhoso na região anterior do corpo cercariano. (D) Microespinhos na abertura da ventosa ventral. (E) Esporocisto encontrado em moluscos infectado. (F) Metacercária obtida de cavidade visceral de girinos de *Rhinella* sp.

Tabela 14 – Dados morfométricos da cercária e metacercária de *Parastrigea* sp. do presente estudo e de *Furcocercaria* XX reportado na Argentina. C: Comprimento; L: Largura.

	<i>Parastrigea</i> sp.		<i>Furcocercaria</i> XX (= <i>Parastrigea</i> sp.)
		Presente estudo	FERNÁNDEZ; HAMANN, 2017 Argentina
Localidade 1º Hospedeiro intermediário		<i>Biomphalaria straminea</i>	<i>B. straminea</i>
Nº glândulas de penetração		8	8
Corpo	C	163 (149-173)	117 (99-131)
	L	48 (43-54)	45 (39-53)
Órgão anterior	C	39 (36-41)	30 (23-37)
	L	25(22-28)	26 (23-30)
Faringe	C	9	11 (9-14)
	L	8 (7-9)	10 (9-11)
Ventosa ventral	C	21 (19-22)	23 (21-30)
	L	22 (19-22)	23 (18-25)
Tronco	C	153 (142-168)	120 (115-126)
	L	39 (33-45)	34 (30-41)
Furcas	C	171 (161-183)	142 (126-149)
	L	13 (12-14)	14 (11-18)
Ocelos	C	6 (5-7)	-
	L	6 (5-7)	-



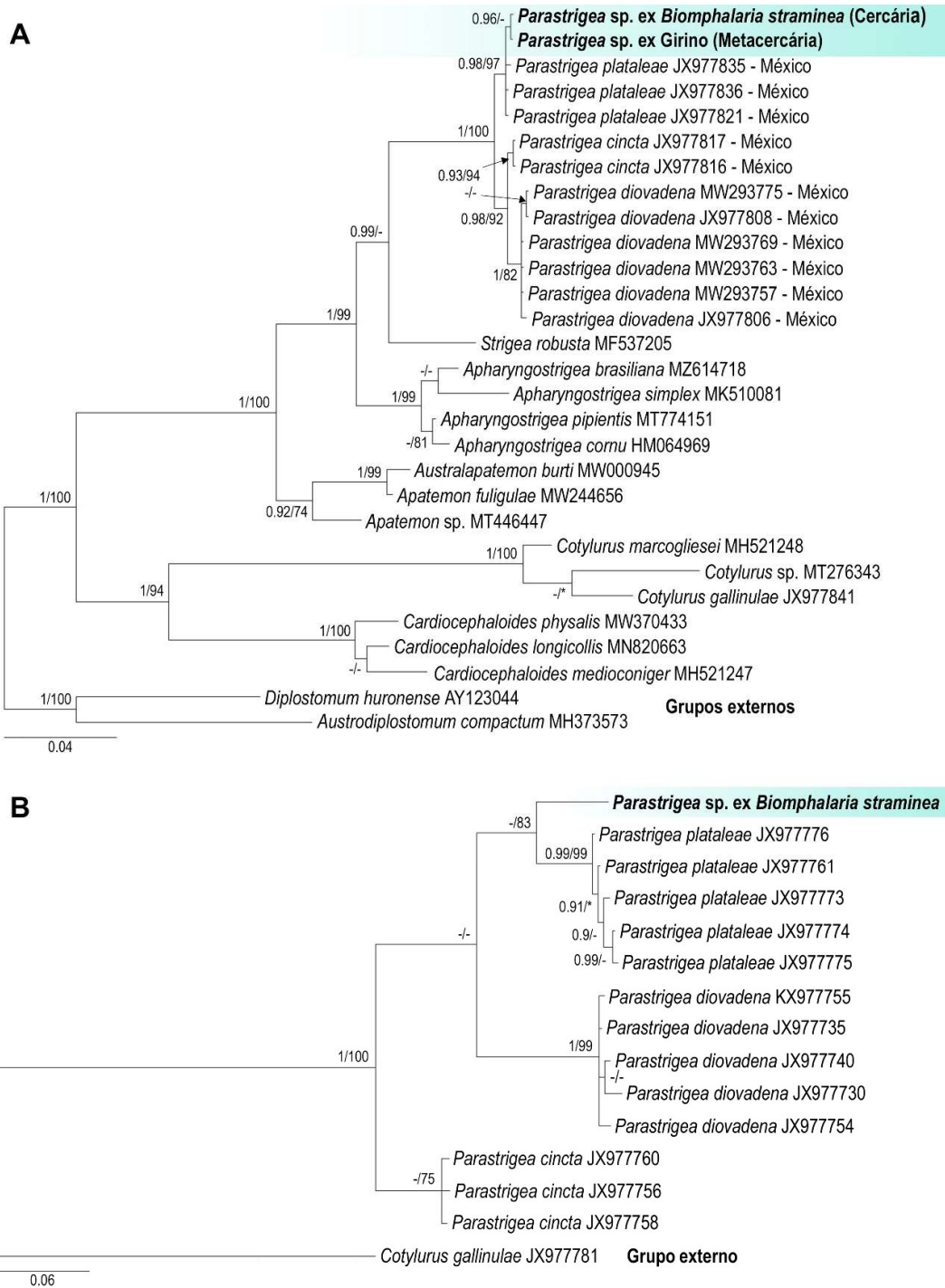


Figura 16 – Reconstruções filogenéticas obtidas pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para *Parastrigea* sp., inferidas através dos marcadores ITS1-5.8S-ITS2 (994 bp, modelo evolutivo GTR + G) e *cox1* (298 bp, modelo evolutivo HKY + G + I). Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.



### 5.3.3 Superfamília Echinostomatoidea Looss, 1899

#### 5.3.3.1 Família Echinochasmidae Odhner, 1910

##### 5.3.3.1.1 Echinochasmidae gen. sp.

Tipo cercariano: Gimnocéfala.

Hospedeiro intermediário: *A. tuberculatum*.

Percentual de infecção total: 0,05% (2/3725).

Local de coleta: Ponto B.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 01/08/2017 (1,45%); 01/09/2017 (0,73%).

##### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=8): Larva com cauda simples (Figura 17A). Corpo cercariano com colar cefálico sem espinho (Figura 17B). Ventosa oral arredondada, 29 (24–31) × 35 (33–36). Células cistogênicas distribuídas lateralmente, desde a região posterior da ventosa oral até a extremidade posterior do corpo. Ventosa ventral pós-equatorial, 35 (33–40) × 33 (29–38), com fileira de espinhos dentiformes. Concreções circulares no interior dos ductos excretores principais, presente em número que varia de 10-12 (Figura 17C). Cauda longa, com extremidade afilada, 273 (239–293) × 32 (31–35). A comparação dos dados morfométricos desta larva com outros representantes da família Echinochasmidae são apresentadas na tabela 15.

##### *Caracterização molecular*

Foi obtido para este parasito sequências de um fragmento do gene 28S (1190 bp). Para determinar a posição filogenética, foi construído um alinhamento com outros membros da superfamília Echinostomatoidea. Na árvore filogenética obtida (Figura 20), foi observado que o parasito se encontra inserido em um clado com outros representantes da família Echinochasmidae, apresentando um bom suporte. No entanto, este parasito apresentou-se em um clado isolado, não sendo verificada uma relação próxima com nenhum dos gêneros com sequências disponíveis para comparação. As divergências genéticas dos parasitos com os gêneros *Echinochasmus* Dietz, 1909, *Stephanoprora* Odhner, 1902 e *Microparyphium* Dietz, 1909 foram de 7,1-7,3%, 7,2-7,4% e 7,1%,

respectivamente. Além disso, foram calculadas as diferenças genéticas entre os gêneros: *Stephanoprora* vs *Echinochasmus*, 5,3-6,5%; *Microparyphium* vs *Echinochasmus*, 3,8-4,7%; *Microparyphium* vs *Stephanoprora*, 4,9-5,4%.

*Comentário:* O parasito detectado em *A. tuberculatum* foi identificado como um membro da família Echinochasmidae com auxílio do marcador 28S. A árvore filogenética obtida revela que o parasito pertence a um gênero que ainda não possui informação molecular para comparação. Morfologicamente, a larva possui microespinhos na abertura da ventosa ventral, como as dos gêneros *Echinochasmus* (SCHOLZ et al., 1996; BESPROZVANNYKH, 2009) e *Microparyphium* (KOGA, 1952), assim como por serem transmitidos por moluscos caenogastrópodes. Não obstante, a cercária do presente estudo distingue-se desses gêneros por apresentar uma cauda longa, maior do que o corpo cercariano.

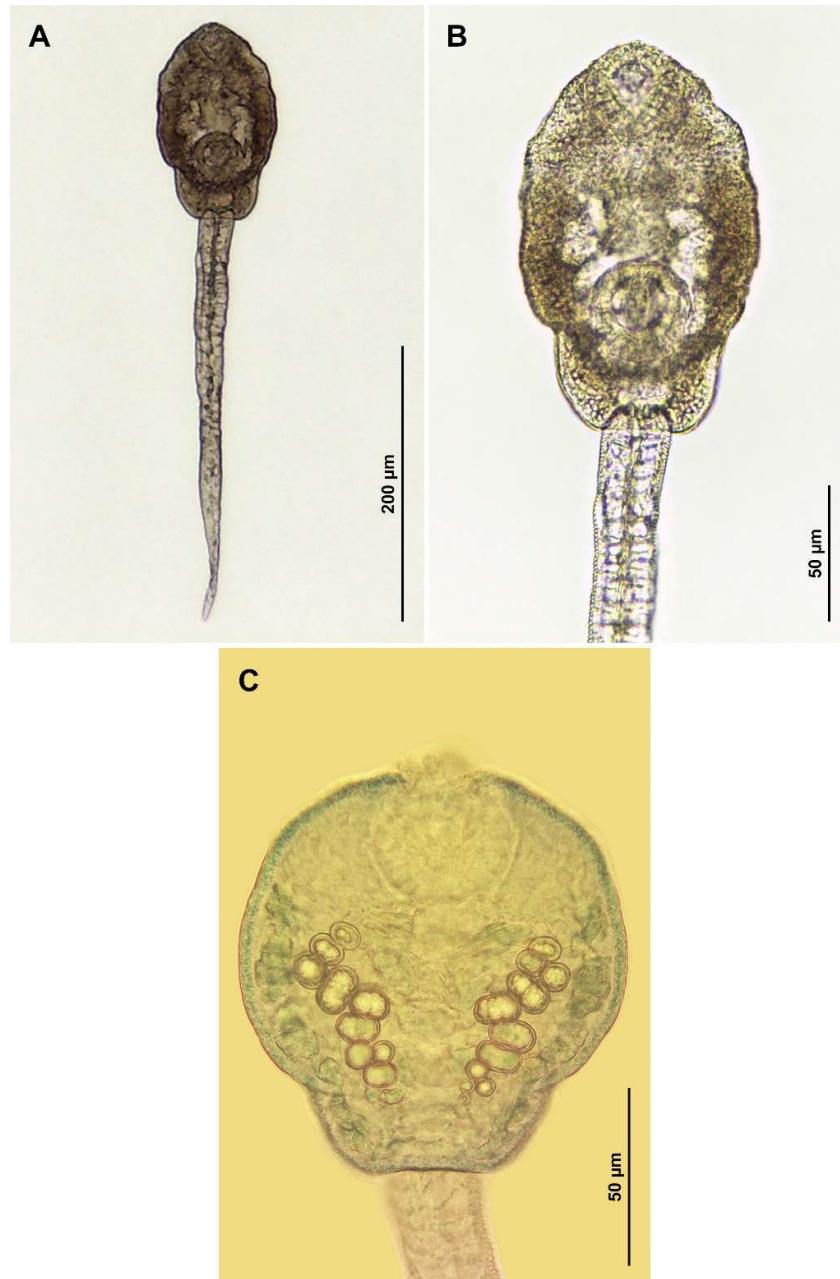


Figura 17 – Echinochasmidae gen. sp. (A) Cercária emergida (fixada em formalina) de *Aylacostoma tuberculatum* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano. (C) Detalhe das conecções circulares e células cistogênicas em cercária corada com sulfato azul do Nilo.

Tabela 15 – Dados morfométricos da cercária de Echinochasmidae gen. sp. e outras espécies da mesma família descritas por diferentes autores. C: Comprimento; L: Largura.

		Echinochasmidae gen. sp.	<i>Echinochasmus japonicus</i>	<i>E. leopoldinae</i>	<i>Microparyphium kyushuense</i>
		Presente estudo	BESPROZVANNYKH, 2009	SCHOLZ et al., 1996	KOGA, 1952
Localidade			Rússia	México	Japão
1° hospedeiro intermediário		<i>Aylacostoma tuberculatum</i>	<i>Parafossarulus spiridonovi</i>	<i>Pyrgophorus coronatus</i>	<i>Semisulcospira libertina</i>
Corpo	C	112 (100-126)	121-124	98-163	90-110
	L	96 (81-112)	63-74	85-148	27,5-37,5
Ventosa oral	C	29 (24-31)	27-33d	30-38	37,5-47,5
	L	35 (33-36)	-	32-43	44,5-57,5
Faringe	C	15 (14-17)	8-11d	-	17,5-22,5
	L	11 (9-12)	-	-	17,5-20
Ventosa ventral (VV)	C	35 (33-40)	22-27	36-38	37,5-52,5
	L	33 (29-38)	22-33	36-39	44,5-57,5
Microespinhos na abertura da VV		Presentes	-	Presentes	Presentes
Cauda	C	273 (239-297)	89-121	82-89	-
	L	32 (31-35)	25-27	24-38	-

### 5.3.3.1.2 *Stephanoprora* sp. 1

Tipo cercariano: Equinocercária – Grupo Magnacauda.

Hospedeiro intermediário: *A. tuberculatum*.

Percentual de infecção total: 0,40% (14/3725).

Local de coleta: Pontos A e B.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 02/08/2017 (0,57%); 31/08/2017 (1,94%); 02/02/2018 (0,65%); 29/03/2018 (1,05%); 25/07/2018 (1,71%); 20/10/2018 (0,42%); 20/04/2019 (0,90%); 23/06/2019 (0,82%); 21/07/2019 (1,2%); 23/08/2019 (0,96%); 24/08/2019 (0,79%).

*Estudo experimental:* 8 exemplares de *P. reticulata* foram expostos a uma solução contendo 150 cercárias. Às 48 horas pós infecção, em dois indivíduos foi detectada o encistamento do parasito nas brânquias do hospedeiro. No entanto, aos 7 DPI, foi realizada a necropsia dos exemplares restantes, os quais não apresentaram metacercárias nas brânquias.

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=20): Larva com cauda extremamente grande, 1896 (1748–2057) × 180 (149–227), com coloração levemente amarronzada e com movimento em S (Figura 18A). Corpo pequeno, 212 (200–229) × 88 (80–95), com tegumento sem microespinhos (Figura 18B). Colar cefálico pouco desenvolvido e sem espinhos. Ventosa oral subterminal, 44 (41–48) × 42 (39–45), com dez espinhos achatados na borda anterior (Figura 18C). Corpo pré-faríngeal pequeno, 10 (7–14) × 14 (11–16), com duas inclusões globulares. Faringe muscular, 26 (23–29) × 12 (11–14). Esôfago alongado que se bifurca antes do acetábulo. Ventosa ventral levemente maior que a oral, 47 (45–52) × 48 (45–50), com uma fileira de 31 espinhos achatados na abertura (Figura 18D). Células cistogênicas distribuídas entre a faringe a extremidade posterior do corpo. As cercárias são produzidas por rédias (Figura 18E). As medidas obtidas do estágio larval e com cercárias semelhantes reportadas por outros autores são apresentadas na tabela 16.

#### *Caracterização molecular*

Foram obtidos fragmentos dos marcadores 28S (1184 bp) e *nad1* (336 bp). A análise da sequência de 28S demonstrou que o parasito se encontra inserido em um clado bem

suportando formado por membros do grupo *Stephanoprora* proposto por Tatonova et al. (2020) (Figura 20). As divergências genéticas foram baixas em relação a *S. pseudoechinata* (0,2%), *S. amurensis* (0,4%) e *S. chasanensis* (0,4%). Já no caso de outras espécies que formam parte desse grupo, foram detectados valores maiores (*E. donaldsoni*, 1,2%; *E. milvi*, 1,7%; *E. mordax*, 1,1%; *E. suiifunensis*, 1,7%). Comparado a espécies dos gêneros *Echinochasmus* e *Microparyphium*, as diferenças genéticas foram 5,3-6,3% e 4,9-5,2%, respectivamente.

*Comentários:* Molecularmente foi determinado que o parasito é um membro do gênero *Stephanoprora*. Comparando com cercárias com caudas proeminentes, presença de corpo pre-faríngeal e ventosa oral com espinhos na borda anterior, a larva do presente estudo diferencia-se por apresentar maior tamanho que a de *S. uruguayense*, assim como por ser transmitido por tiarídeo (vs. Hydrobiidae) (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2007). Morfometricamente, a larva é quase idêntica a de *S. aylacostoma* detectada em *A. chloroticum* na Argentina (OSTROWSKI DE NÚÑEZ; QUINTANA, 2008). É possível que as larvas encontradas em Januária correspondam a *S. aylacostoma*, porém, a obtenção de parasitos adultos ou dados moleculares para a espécie são necessários para a confirmação desta identificação. No território brasileiro, Lutz (1924) reportou a infecção de uma espécie de *Aylacostoma*, a época como *Hemisinus* sp., por *Echinocercaria stylites*. Esta larva também possui uma cauda proeminente e movimento vermiforme, podendo se tratar de uma espécie de *Stephanoprora*. No entanto, a ausência de dados morfométricos impossibilitou a comparação com a cercária aqui caracterizada.

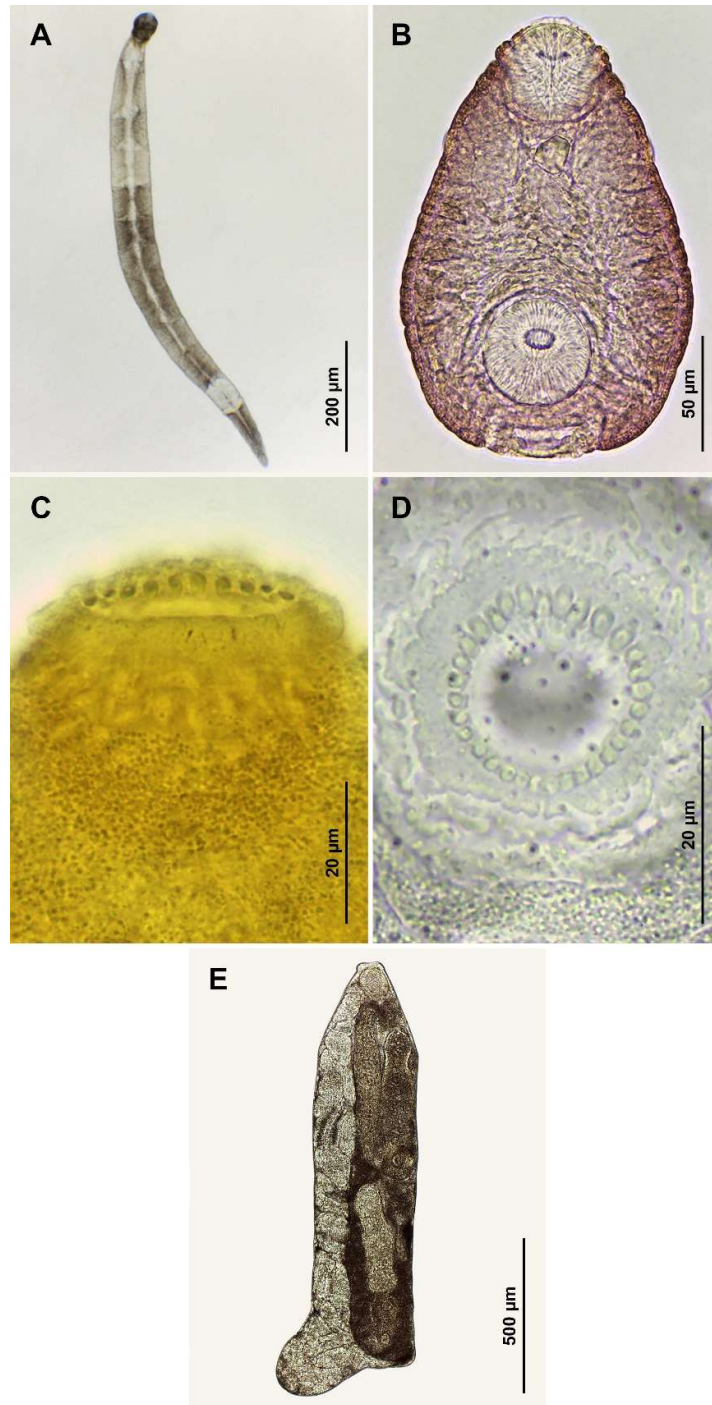


Figura 18 – *Stephanoprora* sp.1. (A) Cercária emergida (*in vivo*) de *Aylacostoma tuberculatum* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano corado com vermelho neutro. (C) Espinhos localizados na borda anterior da ventosa oral. (D) Detalhe dos espinhos presentes na abertura da ventosa ventral. (E) Récia coletada em molusco infectado.

### 5.3.3.1.3 *Stephanoprora* sp. 2

Tipo cercariano: Equinocercária – Grupo Magnacauda.

Hospedeiro intermediário: *Aylacostoma tuberculatum*.

Percentual de infecção total: 0,08% (3/3725).

Local de coleta: Ponto B.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 23/08/2019 (0,96%); 24/08/2019 (0,79%).

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=20): Larva com cauda proeminente, com uma coloração amarronzada (Figura 19A). Corpo cercariano, 215 (204–229) × 95 (88–102), com tegumento sem microespinhos (19B). Colar cefálico levemente desenvolvido e sem espinhos. Ventosa oral subterminal, 42 (39–45) × 40 (36–45), com dez espinhos achatados na borda anterior (Figura 19C). Corpo pré-faríngeal pequeno, 10 (9–14) × 10 (9–13), com duas inclusões globulares. Faringe muscular, 26 (23–27) × 13 (11–14). Ventosa ventral, 47 (45–52) × 47 (45–52), com uma fileira de espinhos achatados na abertura (Figura 19D). Células cistogênicas distribuídas entre a faringe a extremidade posterior do corpo. Canais excretores principais contendo numerosas grânulos refratários pequenos. As cercárias são produzidas por rédias (Figura 19E). As medidas obtidas do estágio larval e com cercárias semelhantes reportadas por outros autores são apresentadas na tabela 16.

#### *Caracterização molecular*

Foram obtidos fragmentos dos marcadores 28S (1245 bp) e *nad1* (507 bp). A sequência do gene ribossomal foi incluída na análise de Echinochasmidae gen. sp e *Stephanoprora aylacostoma*, detectadas no presente estudo. Na árvore filogenética obtida (Figura 20), foi evidenciado que o parasito forma um clado com outros representantes do gênero *Stephanoprora*. A sequência do parasito apresentou 100% de identidade com *S. aylacostoma*. Já na comparação através do marcador *nad1* com esta espécie, a diferença genética foi de 10%, sugerindo tratar-se de uma espécie diferente.

*Comentário:* As características morfológicas gerais desta cercária concordam com as descritas para *Stephanoprora* sp. 1 e *S. aylacostoma*. No entanto, as suas medidas são menores. A diferenciação entre as duas larvas deste gênero encontradas em Januária foi confirmada pelo uso do marcador mitocondrial *nad1*. Outra espécie deste gênero



registrada na América do Sul, *S. uruguayense*, apresenta medidas ligeiramente menores, contudo, diferencia-se por ter como primeiro hospedeiro intermediário a *Heleobia parchappei* (Hydrobiidae vs. Thiaridae) (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2007).

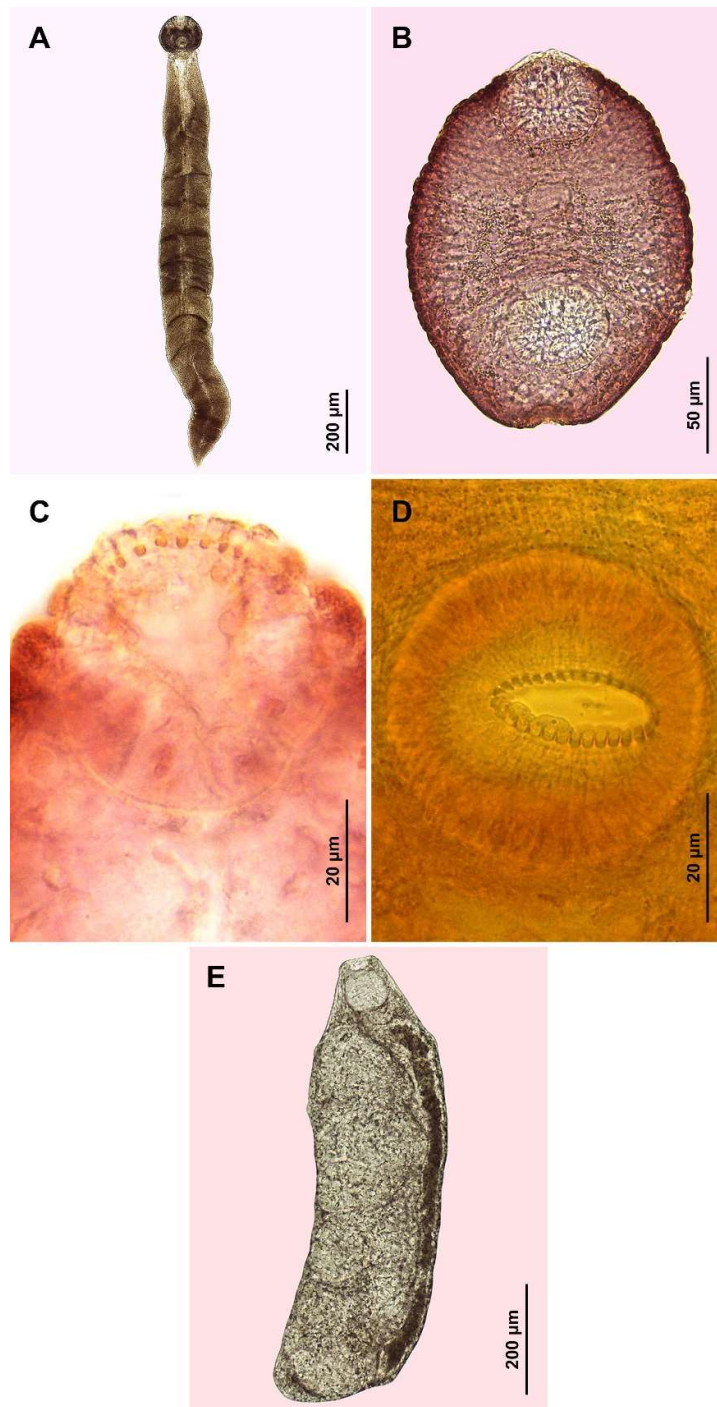


Figura 19 – *Stephanoprora* sp. 2 (A) Cercária emergida (*in vivo*) de *Aylacostoma tuberculatum* coletado no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano corado com Vermelho Neutro. (C) Espinhos localizados na borda anterior da ventosa oral. (D) Abertura da ventosa ventral com espinhos. (E) Rédia coletada de molusco infectado.

Tabela 16 – Dados morfométricos das cercária de *Stephanoprora* spp. encontrados no presente estudo e de outras espécies do gênero relatadas na Argentina. C: Comprimento; L: Largura; d: diâmetro.

		<i>Stephanoprora</i> sp.1	<i>Stephanoprora</i> sp. 2	<i>S. aylacostoma</i>	<i>S. uruguayense</i>
		Presente estudo	Presente estudo	OSTROWSKI DE NÚÑEZ; QUINTANA, 2008	OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2007
Localidade				Argentina	Argentina
1° Hospedeiro intermediário		<i>Aylacostoma tuberculatum</i>	<i>A. tuberculatum</i>	<i>A. chloroticum</i>	<i>Heleobia parchappei</i>
Corpo	C	212 (200-229)	215 (204-229)	250 (239-264)	183 (170-198)
	L	88 (80-95)	95 (88-102)	88 (82-94)	71 (57-79)
Ventosa oral	C	44 (41-48)	42 (39-45)	39 (35-47)	31 (28-32)
	L	42 (39-45)	40 (36-45)	40 (38-44)	32 (28-35)
Corpo prefaringeal	C	10 (7-14)	10 (9-14)	14 (9-16)	13d
	L	14 (11-16)	10 (9-13)	12 (9-13)	-
Faringe	C	26 (23-29)	26 (23-27)	20 (16-25)	16 (13-19)
	L	12 (11-14)	13 (11-14)	14 (13-16)	14 (13-16)
Ventosa ventral	C	47 (45-52)	47 (45-52)	46 (41-47)	35 (32-38)
	L	48 (45-50)	47 (45-52)	42 (38-44)	34 (32-38)
Cauda	C	1896 (1748-2057)	1035 (929-1113)	1919 (1792-2224)	991 (800-1088)
	L	180 (149-227)	104 (79-129)	161 (138-192)	96 (64-112)

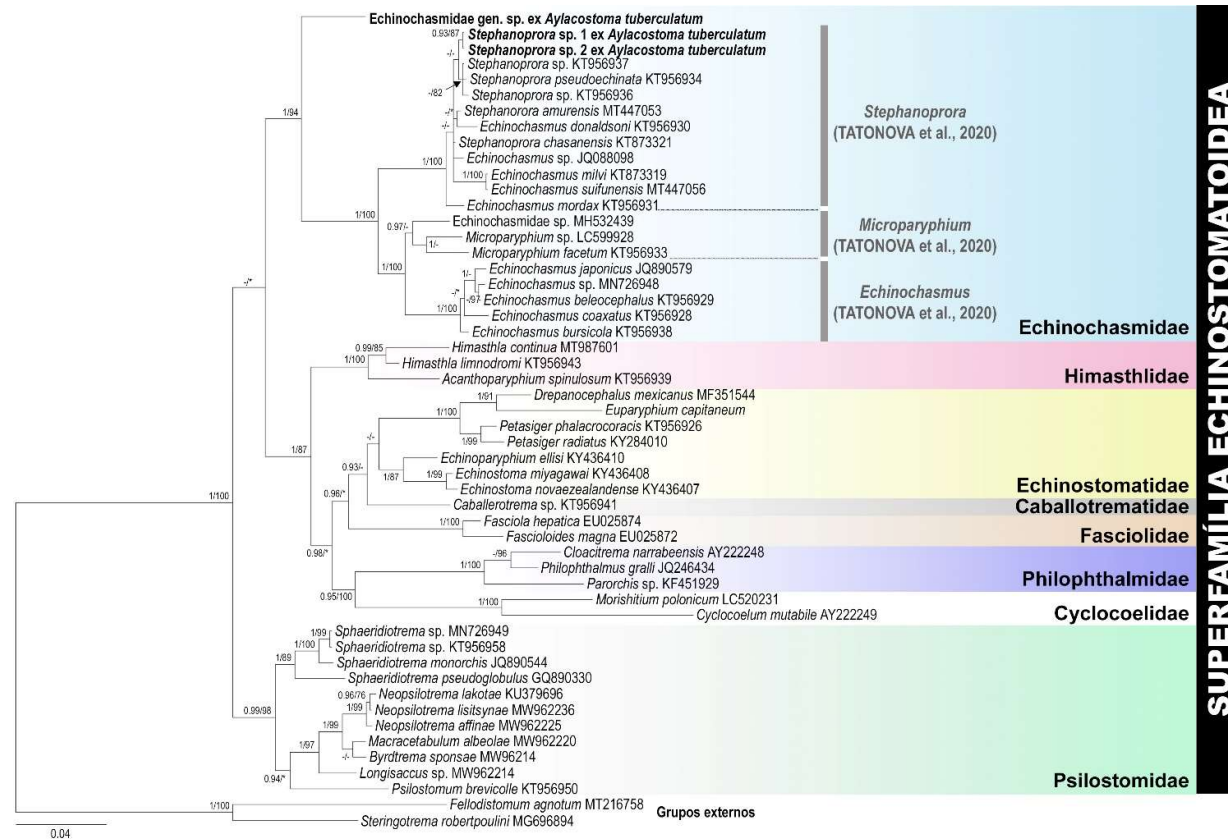


Figura 20 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para representantes da família Echinochasmidae, inferida através de 28S (1064 bp, modelo evolutivo GTR + G + I). Os valores de probabilidade posterior ( $>0,90$ ) e *bootstrap* ( $>70\%$ ) são representados na parte superior de cada nó. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.

### 5.3.3.2 Família Echinostomatidae Looss, 1899

#### 5.3.3.2.1 *Drepanocephalus* sp.

Tipo cercariano: Equinocercária.

Hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,46% (22/4806).

Local de coleta: Ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 13/09/2018 (0,20%); 18/10/2018 (3,28%); 19/10/2018 (3,96%); 22/05/2019 (0,99%); 23/05/2019 (6,45%); 21/06/2019 (0,48%); 22/06/2019 (0,56%).

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=20): Larva com cauda simples (Figura 21). Corpo, 258 (246–276) × 131 (122–141), com colar cefálico conformado por 27 espinhos. Ventosa oral subterminal, 36 (34–39) × 32 (28–36). Faringe muscular, 30 (26–32) × 30 (26–32). Esôfago longo que se bifurca na região anterior à ventosa ventral. Cecos intestinais terminam próximos ao extremo posterior do corpo. Numerosas células cistogênicas distribuídas no corpo. Ventosa ventral arredondada, 39 (34–45) × 48 (43–51), pós-equatorial. Presença concreções circulares no interior dos ductos excretores principais, entre 20 a 25. Cauda, 438 (407–456) × 42 (36–48). Na tabela 17 são apresentados os dados morfométricos comparados com as de cercárias do gênero *Drepanocephalus* Dietz, 1909.

*Comentário:* A morfologia geral, incluindo o número de espinhos no colar cefálico (27) desta cercária concordam com o reportado por Pinto et al. (2016) para larvas de duas espécies do gênero *Drepanocephalus* encontradas em *Biomphalaria* spp. na cidade de Belo Horizonte. Na comparação morfométrica, foi observado que a larva encontrada no presente estudo é menor que as de *D. mexicanus* e *D. spathans* transmitidas também por *B. straminea* (PINTO et al., 2016). Contudo, na ausência de informação molecular, a larva aqui encontrada é identificada como *Drepanocephalus* sp.

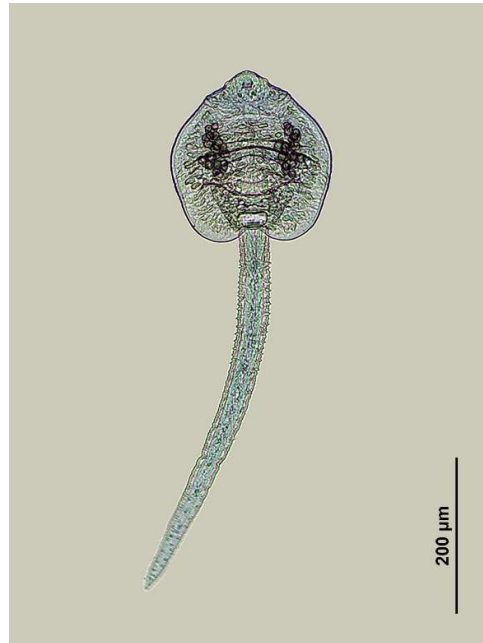


Figura 21 – *Drepanocephalus* sp. Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corado com sulfato azul do Nilo.

Tabela 17 – Dados morfométricos da cercária de *Drepanocephalus* sp. e de outras espécies do gênero reportadas no Brasil. C: Comprimento; L: Largura

		<i>Drepanocephalus</i> sp.	<i>D. spathans</i>	<i>D. mexicanus</i>
		Presente estudo	PINTO et al., 2016	PINTO et al., 2016
Localidade			Brasil	Brasil
1° Hospedeiro		<i>Biomphalaria</i>	<i>B. straminea</i>	<i>B. straminea</i>
intermediário		<i>straminea</i>		
Corpo	C	258 (246-276)	339 (314-362)	317 (307-334)
	L	131 (122-141)	171 (164-177)	146 (137-164)
Ventosa oral	C	36 (34-39)	42 (37-45)	42 (37-45)
	L	32 (28-36)	39 (35-43)	39 (37-42)
Faringe	C	30 (26-32)	25 (20-30)	25 (22-27)
	L	16 (13-19)	16 (15-17)	16 (13-18)
Ventosa ventral	C	39 (34-45)	53 (50-58)	52 (48-58)
	L	48 (43-51)	58 (47-67)	55 (50-58)
Cauda	C	438 (407-456)	539 (512-573)	482 (471-498)
	L	42 (36-48)	53 (48-60)	49 (45-53)

### 5.3.3.2.2 *Echinostoma* sp.

Tipo cercariano: Equinocercária.

Hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,02% (1/4806).

Local de coleta: Ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 11/09/2018 (0,22%).

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=10): Larva com cauda simples (Figura 22A). Corpo, 294 (282–315) × 125 (121–135), com colar cefálico contendo 37 espinhos. Ventosa oral subterminal, 43 (40–47) × 40 (36–43). Pré-faringe curta, 16 (14–17). Faringe arredondada, 26 (24–29) × 16 (14–17). Esôfago alongado, 88 (81–95) de comprimento, com bifurcação anterior ao acetábulo. Ventosa oral arredondada, 55 (52–59) × 52 (48–57), pós-equatorial. Células cistogênicas distribuídas entre o espaço compreendido entre a faringe a extremidade posterior do corpo. Canais excretores principais contendo numerosas concreções circulares na região pré-acetabular. Cauda cilíndrica, 367 (341–391) × 42 (38–47), com membranas natatórias e terminação atenuada (Figura 22B). São produzidas por rédias. Na tabela 18 são comparados os dados morfométricos com larvas de 37 espinhos do gênero *Echinostoma* Rudolphi, 1809 reportados no Brasil.

#### *Caracterização molecular*

Foi obtida uma sequência parcial do marcador 28S para esta larva (1123 bp). A mesma foi alinhada com sequências de representantes da família Echinostomatidae. Na árvore filogenética (Figura 25), se evidenciou que o parasito forma parte de um clado com outras espécies do gênero *Echinostoma*. A divergência genética entre a sequência de *Echinostoma* sp. e as outras 12 espécies com sequências disponíveis para comparação variou entre 1,4% e 2,5%. Já na comparação com outras duas espécies descritas do Brasil, *E. paraensei* Lie & Bash, 1967 e *E. pseudorobustum* (VALADÃO et al., 2021), a diferença genética foram de 1,8% e 2,1%, respectivamente.

*Comentários:* A presença de 37 espinhos no colar cefálico e cauda com membranas natatórias foram indicativos que o parasito se tratava de um membro do gênero

*Echinostoma* (GEORGIEVA et al., 2014), sendo confirmado posteriormente com auxílio do dado molecular. Na comparação morfométrica com cercárias de *Echinostoma* spp., reportadas no Brasil, foi observado que a larva é menor do que as de *E. barbosai*, *E. luisreyi* e *E. rodriguesi*. Além disso, diferencia-se de *E. paraensei* por possuir corpo cercariano maior e cauda menor.



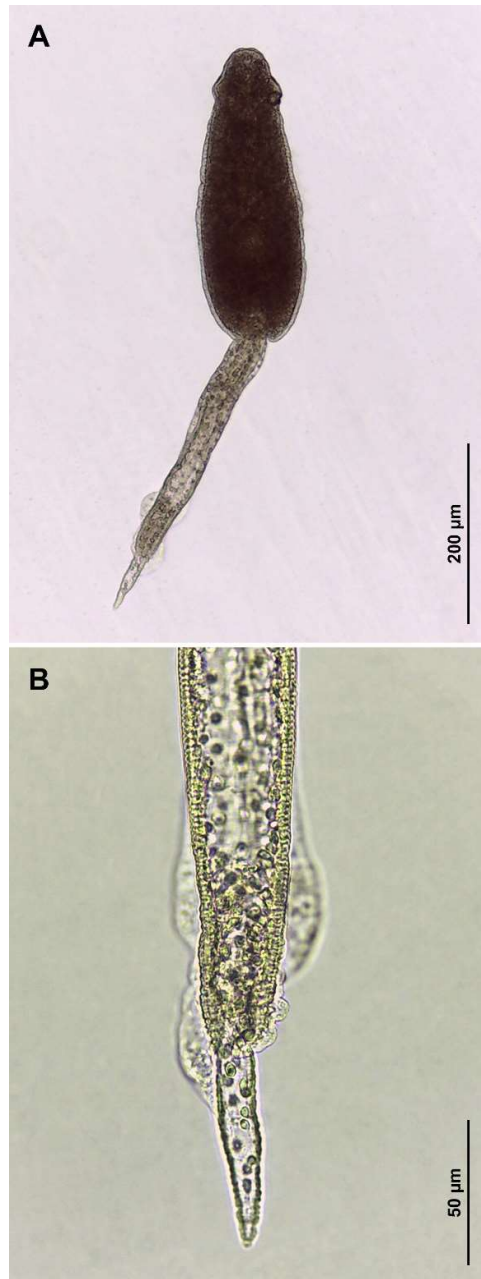


Figura 22 – *Echinostoma* sp. (A) Cercária emergida (fixada em formol) de *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Detalhe das membranas natatórias na cauda.

Tabela 18 – Dados morfométricos das cercária de *Echinostoma* sp. encontrado no presente estudo e de outras espécies do gênero relatados no Brasil. C: Comprimento; L: Largura.

		<i>Echinostoma</i> sp.	<i>E. barbosai</i> LIE; BASCH, 1966	<i>E. paraensei</i> LIE; BASCH, 1967	<i>E. luisreyi</i> MALDONADO JR. et al., 2003	<i>E. rodriguesi</i> HSU et al., 1968
Localidade		Presente estudo	Brasil	Brasil	Brasil	Brasil
1°		<i>Biomphalaria</i>	<i>B. glabrata</i>	<i>B. glabrata</i>	<i>P. marmorata</i>	<i>P. marmorata</i>
Hospedeiro		<i>straminea</i>				
intermediário						
Corpo	C	294 (282-315)	335-423	228-275	417 (326-482)	480-546
	L	125 (121-135)	169-196	117-136	181 (139-252)	189-228
Ventosa oral	C	43 (40-47)	40-52	35-40	57 (48-69)	51-63
	L	40 (36-43)	-	-	-	48-60
Faringe	C	26 (24-29)	23-33	16-25	21 (13-30)	30-36
	L	16 (14-17)	19-24	17-22	-	24-30
Ventosa ventral	C	55 (52-59)	53-65	41-51	71 (61-87)	63-78
	L	52 (48-57)	-	41-51	-	66-81
Cauda	C	367 (341-391)	404-539	412-490	545 (391-673)	540-642
	L	42 (38-47)	38-50	41-47	-	45-57

### 5.3.3.2.3 Echinostomatidae gen. sp.

Tipo cercariano: Equinocercária.

Hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,25% (12/4806).

Local de coleta: ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 20/08/2019 (2,38%); 21/08/2019 (3,02%).

Segundo hospedeiro intermediário e sítio de infecção: *B. straminea*, intramolusco.

*Estudo experimental*: 48 e 56 metacercárias deste equinostomatídeo foram inoculados via oral em dois camundongos. Aos 7 DPI, foi realizada a necropsia dos roedores, não sendo detectada a presença de formas parasitárias.

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=20): Larva com cauda simples (Figura 23A). Corpo cercariano, 239 (208–257) × 144 (133–158), com colar cefálico desenvolvido, contendo entre 60 a 64 espinhos (Figura 23B, C). Tegumento coberto de microespinhos triangulares. Ventosa oral ovalada, 39 (34–43) × 38 (36–41). Corpo pré-faríngeal pequeno, 7 (6–8) × 10 (9–11), contendo numerosos espinhos. Pré-farínge curta, farínge muscular, 25 (23–26) × 17 (15–19). Esôfago alongado que se bifurca antes de atingir o acetábulo. Cecos intestinais atingem a vesícula excretora. Ventosa ventral arredondada, 56 (53–58) × 56 (54–60), pós-equatorial. Células cistogênicas numerosas, ocupando o espaço compreendido entre a farínge e a extremidade posterior do corpo. Canais excretores principais contendo numerosas concreções circulares na região pré-acetabular. Cauda longa, 419 (394–439) × 44 (39–47), com duas membranas natatórias e terminação puntiforme. São produzidas por rédias (Figura 23D). Na tabela 19 é apresentada a comparação morfométrica com cercárias semelhantes encontradas na Argentina (OSTROWSKI, 1974; OSTROWSKI et al., 1997; FERNÁNDEZ et al., 2014).

Metacercária (n=11): Cisto arredondado, 162 (149–186) de diâmetro, com parede cística fina (Figura 23E). O estágio larval foi encontrado após dissecação do molusco.

*Comentários*: Pela presença de colar cefálico, a cercária foi identificada como do tipo Equinocercária (PINTO; MELO, 2013c). Esta apresentou corpo pré-faríngeal, também

reportado em *Echinocercaria* XIII emergida de *B. straminea* na Argentina (FERNÁNDEZ et al., 2014). Porém, a cercária do presente estudo diferencia-se por apresentar menor tamanho e maior número de espinhos no colar cefálico (60–64 vs 53–54). Outra cercária reportada no território argentino, e que possui corpo pré-faríngeal com pequenos espinhos formando roseta, espinhos numerosos no colar cefálico (>50) e membranas natatórias na cauda é *Echinocercaria* sp. V (OSTROWSKI et al., 1997). Contudo, esta larva distingue-se por apresentar corpo e cauda maiores. Adicionalmente, na Argentina foi descrita a presença de corpo pré-faríngeal na cercária de *Echinochasmus suspensum* (Braun, 1901), mas a larva diferencia-se por também possuir dimensões maiores (OSTROWSKI, 1974).

No continente africano, Laidemitt et al. (2019) reportaram a transmissão de larvas semelhantes em planorbídeos, identificadas molecularmente como *Patagifer* sp. 1 e *Patagifer* sp. 2. Ressalta-se que a primeira possui quase o mesmo número de espinhos no colar cefálico (58–62). Contudo, os autores não apresentaram as medidas da larva, impossibilitando a comparação com a caracterizada no presente estudo.

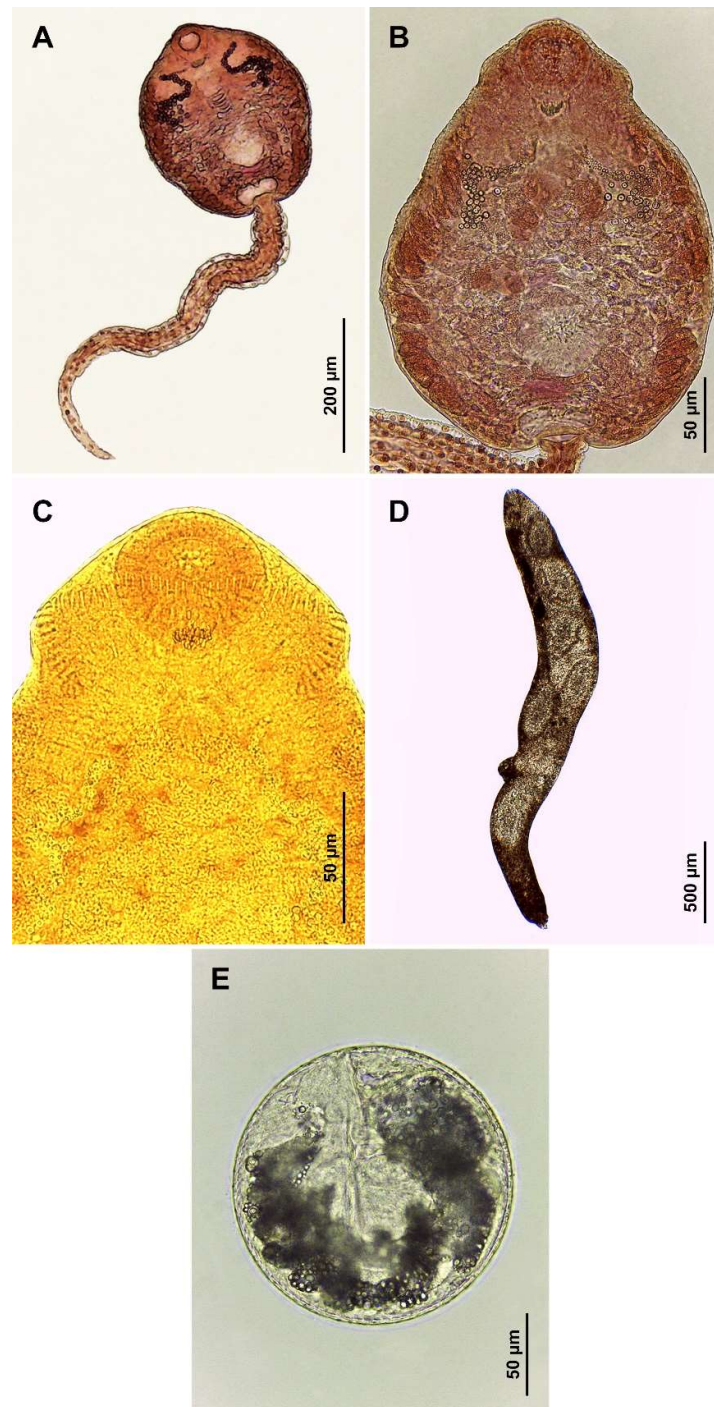


Figura 23 – Echinostomatidae gen. sp. (A) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano corado com vermelho neutro. (C) Detalhe do colar cefálico com espinhos. (D) Rédia. (E) Metacercária encistada, recuperada de *B. straminea*.

Tabela 19 – Comparação morfométricas da cercária de Echinostomatidae gen. sp. encontrado no presente estudo com semelhantes relatadas na Brasil. C: Comprimento; L: Largura.

		Echinostomatidae gen. sp.	<i>Echinochasmus</i> (= <i>Episthmium</i> ) <i>suspensum</i> OSTROWSKI, 1974	<i>Echinocercaria</i> sp. V OSTROWSKI et al., 1997	<i>Echinocercaria</i> sp. XIII FERNÁNDEZ et al., 2014
		Presente estudo <i>Biomphalaria</i> <i>straminea</i>	Argentina	Argentina <i>B. orbigny</i>	Argentina <i>B. straminea</i>
Localidade					
1º Hospedeiro intermediário					
Nº de espinhos no colar cefálico		60-64	-	>50	53-54
Corpo	C	239 (208-257)	592-666	412 (361-479)	650 (540-780)
	L	144 (133-158)		189 (168-210)	166 (150-220)
Ventosa oral	C	39 (34-43)	52-65	59 (50-67)	47 (46-67)
	L	38 (36-41)		50 (42-59)	47 (41-57)
Corpo prefaringeal	C	7 (6-8)		-	16 (15-17)
	L	10 (9-11)		-	14 (13-16)
Faringe	C	25 (23-26)		27-29	28 (23-32)
	L	17 (15-19)		17-21	18 (16-18)
Ventosa ventral	C	56 (53-58)	65-91	75 (67-84)	67 (61-73)
	L	56 (54-60)		74 (67-84)	66 (57-74)
Cauda	C	419 (394-439)	555-592	603 (546-672)	595 (490-712)
	L	44 (39-47)		59 (50-67)	49 (30-58)

#### 5.3.3.2.4 *Ribeiroia* sp.

Tipo cercariano: Gimnocéfala.

Hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,02% (1/4806).

Local de coleta: Ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 22/06/2019 (0,28%).

##### *Caracterização morfológica*

Cercária: Larva de cauda simples (Figura 24A). Corpo espinhoso. Ventosa oral subterminal. Faringe muscular. Esôfago com um par de divertículos laterais e bifurcação pré-acetabular. Cecos intestinais sinuosos que terminam próximos à vesícula excretora. Ventosa ventral equatorial, com membrana pregueada nas margens (Figura 24B). Concreções circulares numerosas presentes nos condutos excretores principais. São produzidas por rédias alongadas (Figura 24C). Dados morfométricos não foram obtidos devido à emergência de poucas larvas.

##### *Caracterização molecular*

Foram obtidas sequências dos marcadores 28S (1005 bp) e ITS2 (398 bp) do parasito. Na árvore filogenética construída a partir de sequências 28S, foi observado que o parasito se encontra agrupado em um clado com outras espécies do gênero *Ribeiroia* (Figura 25). Os isolados norte-americanos de *R. ondatrae* agruparam-se em um clado separado, sendo verificado uma divergência genética de 0,3% em relação ao isolado de Januária. Além disso, evidenciou-se que o parasito forma um clado com espécies reportada no Quênia (LAIDEMITT et al., 2019), porém, com valor de probabilidade posterior inferior a 0,90. Foi detectado 100% de similaridade com *Ribeiroia* sp. 2. As divergências genéticas com relação a *Ribeiroia* sp. 1 e *Ribeiroia* sp. 3 relatados nesse país foram de 0,6% e 0,8%, respectivamente. No caso do gene ITS2, foi possível realizar a comparação com três espécies relatadas no continente americano. As divergências genéticas com *R. marini* e *R. ondatrae* (WILSON et al., 2005) foram 0,8% e 1,3%, respectivamente. Já na comparação com *Ribeiroia* sp. detectado em *Biomphalaria* sp. na Argentina (DAVIES et al., 2015), a diferença molecular foi de 0,3%.

*Comentários:* As características morfológicas estão de acordo com as descrições para *Ribeiroia* sp. realizadas por Pinto et al. (2013) e Davies et al. (2015). A presença de divertículos laterais no esôfago e de membrana pregueada na ventosa oral são características das larvas deste gênero. A identificação foi complementada através da análise molecular, porém, apenas a futura obtenção de sequências mitocondriais permitirá a identificação até o nível de espécie.



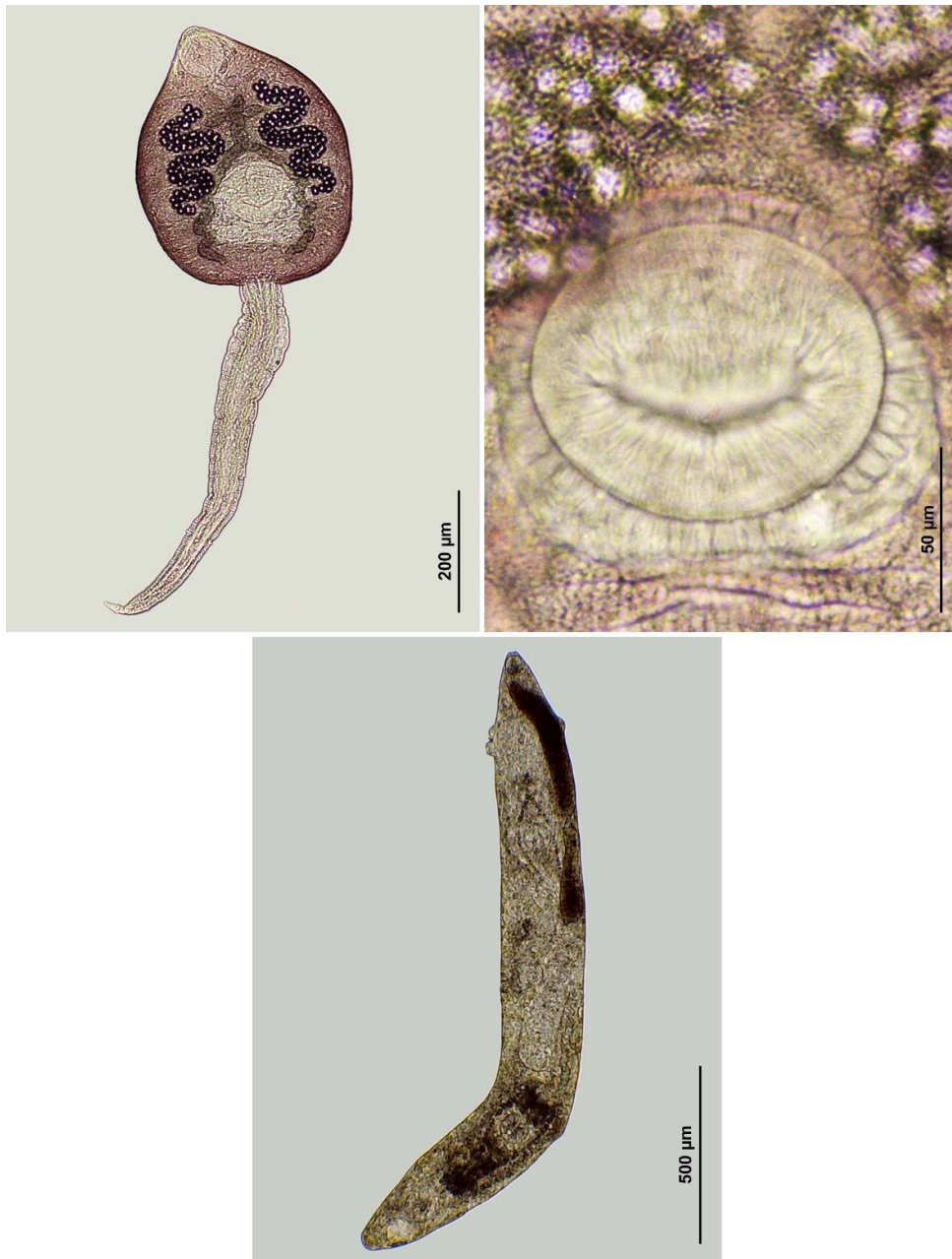


Figura 24 – *Ribeiroia* sp. (A) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada com vermelho neutro. (B) Detalhe da membrana pregueada na ventosa ventral (C) Rédia recuperada de molusco infectado.

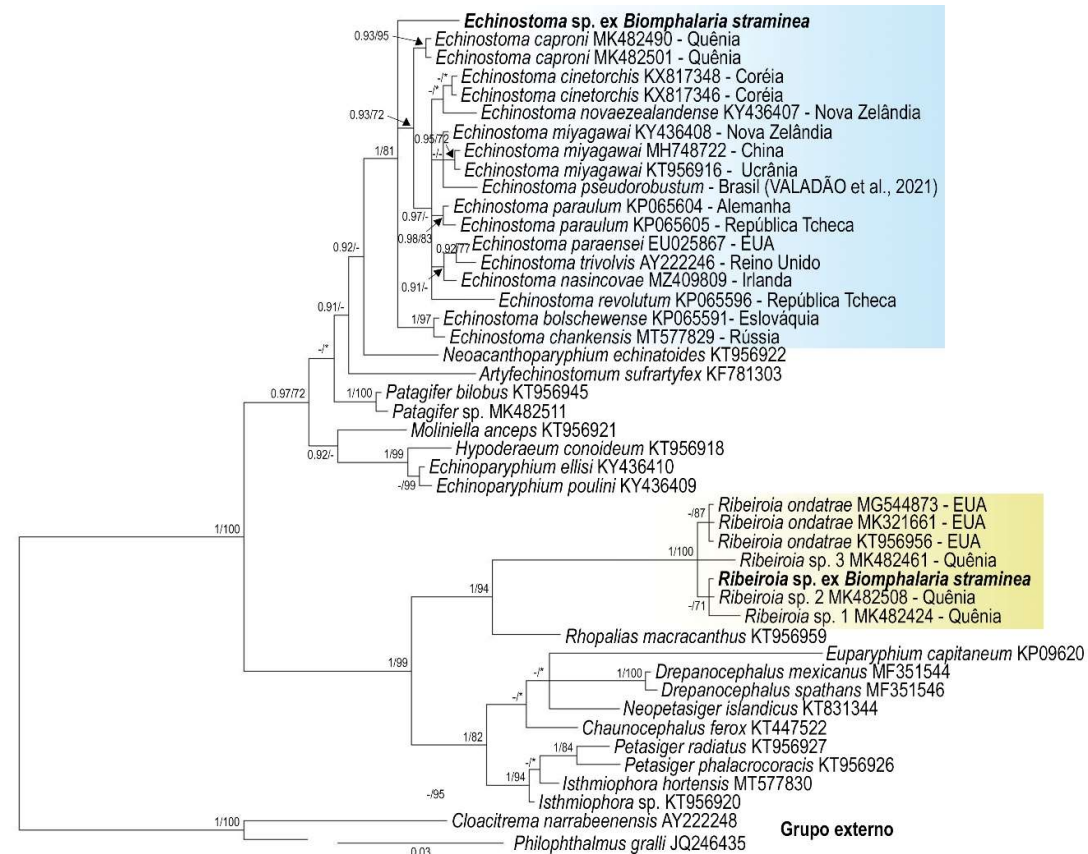


Figura 25 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para representantes da família Echinostomatidae, inferida através de 28S (729 bp, modelo evolutivo GTR + G + I). Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. (\*) Asteriscos nos nós sinalizam diferenças na topologia recuperada por MV. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.

### 5.3.3.3 Família Philophthalmidae Looss, 1899

#### 5.3.3.3.1 *Philophthalmus* sp. nov

Tipo cercariano: Megalura.

Hospedeiro intermediário: *Aylacostoma chloroticum*, *A. tuberculatum*.

Percentual de infecção total: 0,04% (2/5017)

Local de coleta: Ponto B.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 02/08/2017 (0,53%); 21/04/2019 (1,19%).

Hospedeiro definitivo experimental: *Gallus gallus domesticus*.

*Estudo experimental:* Foi realizada a infecção de dois exemplares de *Gallus gallus domesticus*, inoculando 30 e 45 metacercárias pela via ocular, respectivamente. Foi detectada a presença do verme adulto no saco conjuntival das aves, sendo realizadas as necropsias aos 36 e 45 DPI. As formas de ovo e miracídio também foram observados e submetidas a análise morfológica.

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (emergida de *A. tuberculatum*, n=8): Larva com cauda simples (Figura 26A). Corpo alongado, 374 (317–415) × 118 (107–125), com tegumento com finos microespinhos e uma constrição ao nível da ventosa ventral. Ventosa oral subterminal, 61 (53–67) × 59 (56–63). Pré-faringe curta. Faringe muscular, 61 (53–67) × 59 (56–63), seguida de esôfago com bifurcação anterior a ventosa ventral. Cecos intestinais longos, com terminação próxima da vesícula excretora. Ventosa ventral arredondada, 70 (66–73) × 75 (67–80), levemente pós-equatorial. Cauda cilíndrica, 376 (353–406) × 39 (36–43), com glândulas adesivas na porção terminal.

A cercária emergida de *A. chloroticum* (n=4): apresentou as mesmas características que a encontrada em *A. tuberculatum*, mas com algumas variações nas medidas. Corpo cercariano mais alongado, 459 (440–475) × 96 (88–100). Ventosa oral, 69 (66–71) × 54 (52–55). Faringe, 36 (32–38) × 20 (18–21). Ventosa ventral, 71 (68–75) × 75. Cauda, 372 (340–404) × 37 (34–41). Na tabela 20 são apresentadas as comparações morfométricas das larvas emergidas de *Aylacostoma* spp. com as de espécies de *Philophthalmus* relatados no continente americano.

Metacercária (n=4): Cisto piriforme (Figura 26B), 336 (310–366) × 196 (188–205).

Rédia (recuperada de *A. chloroticum*, n=20): Corpo alongado, 1385 (1220–1602) × 302 (255–355) (Figura 26C). Faringe pequena, 59 (54–71) × 59 (52–71). Ceco intestinal longo, ocupando 47–57% do corpo. Presença de um par de apêndices locomotores laterais, próxima do apêndice caudal.

Adultos (baseado em exemplares recuperados no dia 45, n=5): Corpo alongado, 4114 (3823–4405) × 1392 (1312–1453), com uma constrição ao nível do acetábulo, atenuado no extremo anterior, porção posterior arredondada (Figura 26D). Máxima largura na região pós-acetabular. Tegumento liso. Ventosa oral subterminal, 301 (284–312) × 366 (312–390), seguida de faringe curta, 17 (12–22). Faringe muscular, 255 (248–262) × 274 (262–291). Relação da largura da ventosa oral/faringe 1:0.8 (0.7–0.9). Esôfago, 56 (29–100), com bifurcação dos cecos anterior a ventosa ventral. Cecos intestinais simples, estendendo-se próximo da margem posterior do testículo posterior. Ventosa ventral maior que a ventosa oral, 598 (567–610) × 576 (560–588), pré-equatorial. Relação da largura das ventosas 1:1.6 (1.4–1.9). Poro genital bifurcal. Saco do cirro alongado, 919 (759–1064) × 143 (118–164), correspondendo ao 22% (18–26) do comprimento do corpo, sem exceder o borde posterior da ventosa ventral (exceção verificada em um exemplar). Cirro sem espinhos. Vesícula seminal alongada. Ovário ovalado, 217 (191–255) × 274 (255–291), pré-testicular. Útero enovelado, ocupando o espaço entre a ventosa ventral e o testículo anterior. Receptáculo seminal ovalado ou levemente alongado. Testículos em tandem, lisos ou levemente lobulados. Testículo anterior, 492 (425–553) × 594 (532–695); testículo posterior, 545 (489–610) × 580 (532–638). Vitelária tubular, extracecal, ocupando entre 72% a 89% do espaço compreendido entre a ventosa ventral e o testículo anterior. Poro excretor terminal. Vesícula excretora em forma de Y. Os ductos excretores estendem-se próximo ao nível da faringe.

Espécimes adultos recuperados no dia 36 pi (n=10): Morfologicamente semelhantes aos exemplares descritos acima, porém, apresentando menor tamanho. Contudo, a relação das ventosas e as dimensões dos ovos maduros foram similares. Na tabela 21 são apresentadas as comparações morfométricas do parasito com outras reportadas em ambiente dulciaquícolas (*P. gralli* e *P. megalurus*) e com as que se desconhece o molusco transmissor (*P. lachrymosus* e *P. semipalmatus*).

Ovos maduros (n=10): formato ovalado, 108 (93–125) × 47 (43–55), não operculados, de coloração amarelada, contendo miracídio (Figura 26E).

Miracídio (n=23): Corpo ovalado, 158 (148–168) × 64 (57–75), com tegumento ciliado (Figura 26F). Presença de ocelo, 20 (16–23) × 15 (11–21). Rédia desenvolvida no interior.

#### *Caracterização molecular*

Um fragmento de 28S (1143 pb) foi obtido para a cercária emergida de *A. tuberculatum*. Foi construído um alinhamento com sequências de representantes da família Philophthalmidae, o qual foi utilizado nas análises filogenéticas. A árvore obtida mostrou que o parasito se encontra inserido em um clado contendo os membros do gênero *Philophthalmus* Looss, 1899 (Figura 27A). A presente espécie apresenta-se como grupo irmão do clado formado por *P. lucipetus* (Rudolphi, 1819) + (*Philophthalmus* sp. + *P. lachrymosus* Braun, 1902). A divergência interespecífica variou entre 0,7% e 1,7%. Já as diferenças genéticas com relação às espécies do gênero *Parorchis* e *Cloacitrema* foram de 5,9-6,9% e 3,9-5%, respectivamente.

Sequências parciais do gene *cox1* para larvas coletadas *A. chloroticum* (784 bp) e *A. tuberculatum* (793 bp) foram obtidas. A divergência molecular entre ambos isolados foi de 2,1%, indicando coespecificidade. As sequências foram alinhadas com as de outros filoftamídeos e submetidas a análise filogenética que evidenciou que o parasito encontrado em Januária forma um clado com um isolado identificado como *Philophthalmus* sp. recuperado de *A. chloroticum* no Rio Paraná (ONACA et al., 2020) (Figura 27B). A divergência entre estes isolados brasileiros foi relativamente baixa (0,16-2,27%). Adicionalmente, foi observado que este parasito é grupo irmão de *P. gralli*, com bom suporte no nó. A divergência genética entre ambas taxas foi 11,97-12,29%. Foi calculada a divergência interespecífica entre as espécies do gênero, variando entre 11,97% e 14,72%. Já no caso da comparação com o *Parorchis* sp., a diferença foi maior (17%).

*Comentário:* As características morfológicas da forma adulta como vitelária formando túbulos ininterruptos extracecais, ventosa ventral pré-equatorial, testículos em tandem na extremidade posterior, ovário pré-testicular, e o sítio de infecção, estão de acordo com a

diagnose do gênero *Philophthalmus* (KANEV et al., 2005; DRONEN; FRIED, 2008), sendo corroborado pela análise molecular. Morfologicamente, *Philophthalmus* sp. nov. compartilha o mesmo tipo de vitelária com *P. gralli*, mas difere pela relação das larguras das ventosas e ovos maiores (em espécimes corados) (MUNIZ-PEREIRA; AMATO, 1993; PINTO; MELO 2010b). *Philophthalmus lachrymosus* diferencia-se por possuir vitelária folicular, com menor extensão no espaço compreendido entre a ventosa ventral e testículo anterior, e a largura da faringe é igual ou levemente maior a da ventosa oral (FREITAS, 1955; NASIR; DÍAZ, 1972). Na comparação com *P. semipalmatus*, outra espécie reportada em América do Sul (NASIR; DÍAZ, 1972), o parasito do presente estudo apresenta uma ventosa ventral menos proeminente, menor relação entre as ventosas, além de ovos maiores. *Philophthalmus megalurus* diferencia-se pelo maior comprimento do corpo e ovos (WEST, 1961; MCMILLAN, 1971).

De forma complementar, a comparação morfométrica da cercária do presente estudo diferencia-se de *Philophthalmus* sp. reportado no Rio Paraná por apresentar um corpo cercariano mais estreito e cauda maior. A larva de *P. gralli* distingue-se por possuir corpo e cauda maiores. Já a cercária de *P. megalurus* se caracteriza por possuir uma proeminente cauda. Adicionalmente, esta última espécie é transmitida por moluscos das famílias Pleuroceridae [*Goniobasis virginica* (Gmelin, 1791) and *Pleurocera acuta* Rafinesque, 1831] e Semisulcospiridae [*Juga plicifera* (Lea, 1838)] (WEST, 1961; MCMILLAN 1971; HUFFMAN; FRIED, 1983). As características morfológicas da forma adulta e do estágio de cercária deste parasito, associadas aos dados moleculares, revelaram que se trata de uma nova espécie do gênero *Philophthalmus*.

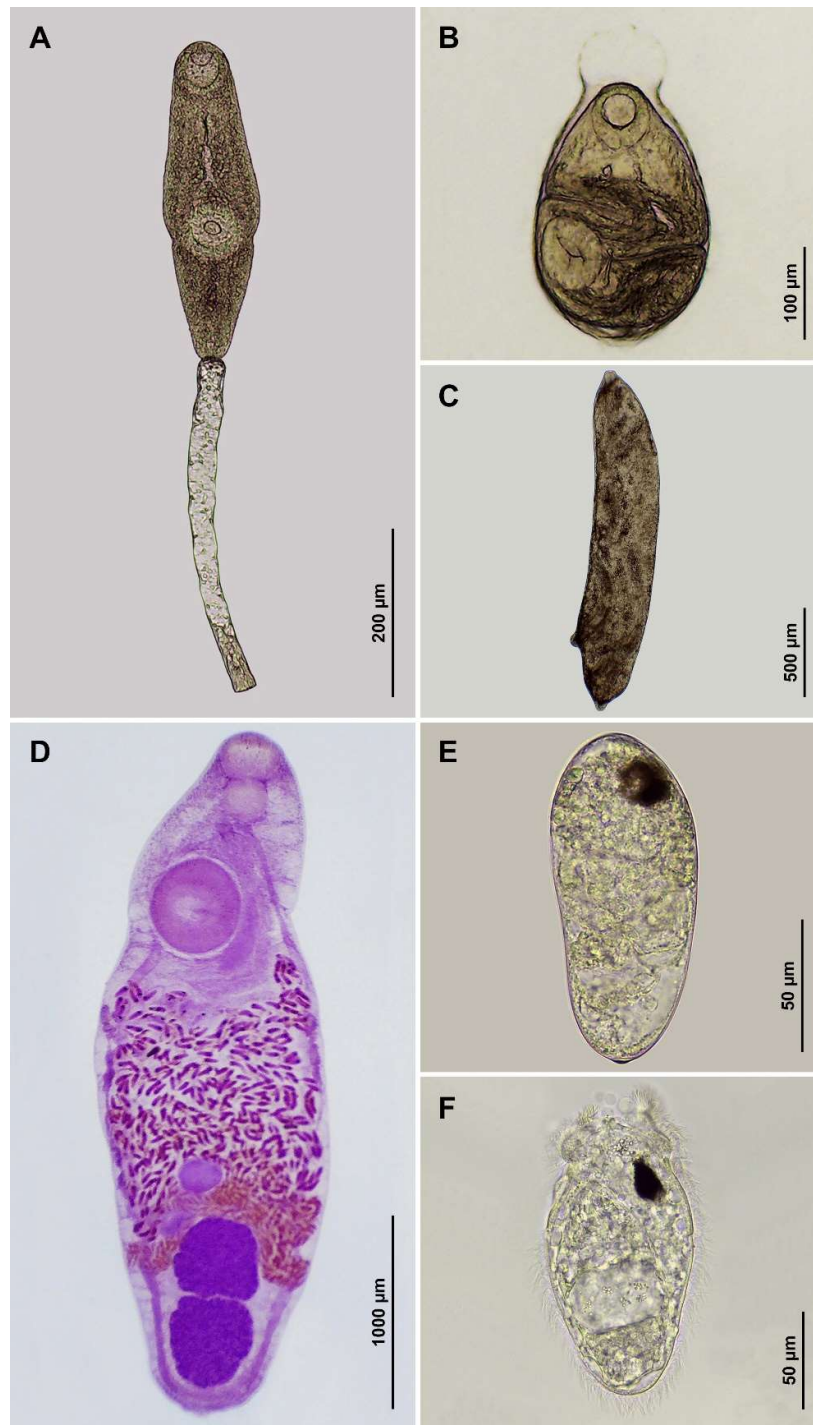


Figura 26 – *Philophthalmus* sp. nov. (A) Cercária emergida de *Aylacostoma tuberculatum* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Metacercária encistada em substrato sólido. (C) Rédia recuperada de *A. chloroticum*. (D) Espécime recuperado de *Gallus gallus domesticus* no dia 45 pós-infecção corado pelo carmim. (E) Ovo maturo. (F) Miracídio.

Tabela 20 – Dados morfométricos da cercária de *Philophthalmus* sp. nov. encontrada no presente estudo e de outras espécies do gênero reportadas em ambiente dulciaquícolas no continente americano. C: Comprimento; L: Largura; d: diâmetro.

	<i>Philophthalmus</i> sp.			<i>P. gralli</i>		<i>P. megalurus</i>	
	Presente estudo		ONACA et al., 2019 Brasil	DÍAZ et al., 2002 Venezuela	PINTO; MELO, 2010 Brazil	WEST, 1961 EUA	MCMILLAN, 1971 EUA
Localidade							
Hospedeiro intermediário	<i>Aylacostoma chloroticum</i>	<i>A. tuberculatum</i>	<i>A. chloroticum</i>	<i>Melanoides tuberculata</i>	<i>M. tuberculata</i>	<i>Goniobasis</i> sp., <i>Pleurocera acuta</i>	<i>Juga (=Oxytrema) plicifera</i>
Corpo	C 459 (440–475)	374 (317–415)	487 (420–553)	456–598	535 (420–580)	540–670	550 (470–790)
	L 96 (88–100)	118 (107–125)	157 (145–171)	101–162	128 (110–140)	120–130	120 (110–120)
Ventosa oral	C 69 (66–71)	61 (53–67)	–	55–64	58 (50–69)	60	50 (50–60)
	L 54 (52–55)	59 (56–63)	–	51–61	55 (49–65)	40–50	40 (30–60)
Faringe	C 36 (32–38)	32 (28–34)	–	26–40	–	30–40	30
	L 20 (18–21)	20 (17–23)	–	18–28	–	10–20	20
Ventosa ventral	C 71 (68–75)	70 (66–73)	–	–	68 (65–78)	60–70d	60 (50–70)d
	L 75	75 (67–80)	–	–	75 (60–80)	–	–
Cauda	C 372 (340–404)	376 (353–406)	259 (206–318)	294–446	434 (302–485)	930–1140	630 (470–890)
	L 37 (34–41)	39 (36–43)	46 (43–53)	30–50	54 (36–62)	40–50	20 (10–20)



Tabela 21 – Comparação morfométrica de *Philophthalmus* spp. reportados no continente americano por diferentes autores. C: Comprimento; L: Largura; d: diâmetro. \*Medidas obtidas de ilustrações.

	<i>Philophthalmus</i> n. sp.		<i>P. gralli</i>	<i>P. lachrymosus</i>		<i>P. megalurus</i>		<i>P. semipalmatus</i>	
Localidade	Presente estudo Brasil		MUNIZ-PEREIRA; AMATO, 1993 Brasil	PINTO; MELO; 2010a Brasil	FREITAS, 1955 Brasil	NASIR; DÍAZ, 1972 Venezuela	WEST, 1961 EUA	MCMILLAN 1971 EUA	NASIR; DIAZ, 1972 Venezuela
Corpo	C 4114 (3823–4405)	2860 (2257–3404)	2710 (2120–3710)	3610 (3100–4070)	4190–4620	4000	3420–8360	4800–6000	2624–4475
	L 1392 (1312–1453)	759 (631–950)	834 (604–1280)	1020 (860–1210)	1380–1640	1500	670–2070	1530–2000	960–1794
Ventosa oral (VO)	C 301 (284–312)	244 (206–277)	260 (204–329)	330 (316–339)	300–310	416d	200–370	280–370	216–363
	L 366 (312–390)	277 (234–319)	332 (277–421)	401 (374–421)	360–430	–	210–470	300–470	253–485
Faringe (FA)	C 255 (248–262)	170 (142–191)	226 (183–293)	299 (279–316)	310–350	543d	190–350	290–330	225–333d
	L 274 (262–291)	194 (163–213)	277 (183–403)	339 (326–358)	380–460	–	170–310	270–370	–
Ventosa ventral (VV)	C 598 (567–610)	486 (425–546)	418 (343–549)	514 (479–542)	610–690d	782d	430–700d	480–670d	889
	L 576 (560–588)	448 (404–496)	391 (343–494)	514 (479–542)	–	–	–	–	944
Ovário	C 217 (191–255)	130 (99–156)	153 (88–219)	237 (211–258)	200–210	400d	120–370d	220–320	188–394d
	L 274 (255–291)	167 (121–213)	181 (88–256)	266 (245–300)	180–220	–	–	280–300	–
Testículo anterior	C 492 (425–553)	291 (184–347)	258 (161–416)	222 (179–263)	360–480	347d	270–1100	370–600	188–297
	L 594 (532–695)	387 (305–432)	329 (241–504)	403 (279–453)	460–550	–	250–870	630–740	206–563
Testículo posterior	C 545 (489–610)	320 (262–440)	248 (161–438)	216 (174–247)	380–480	347d	250–1010	380–590	188–454
	L 580 (532–638)	372 (305–468)	319 (241–504)	351 (268–421)	450–530	–	210–890	480–830	216–669
Ovos	C 108 (104–114)	106 (100–114)	70 (64–90)	73 (60–87)	94–97	–	80	–	60–69
	L 37 (36–38)	38 (36–40)	Colapsado	32 (27–36)	38–42	–	40	–	18–30
VO/VV	1:1.6 (1.4–1.9)	1:1.6 (1.5–1.8)	1:1.1–1.3	1:1.2 (1–1.5)	1:1.5–1.7*	1:1.9	1:1.4*	1:1.6–1.8	1:2.2*
VO/FA	1:0.8 (0.7–0.9)	1:0.7	1:0.6–1	1:0.9 (0.5–1.1)	1:1–1.1*	1:1.3*	1:0.7*	1:1.1*	1:0.7*
Vitelária	% 82 (72–89)	74 (61–84)	79–89	87 (73–87)	45 (37–54)*	41 & 54*	92 & 84*	85%*	63 & 74*
Tipo de vitelária	Tubular	Tubular	Tubular	Tubular	Folicular	Folicular	Tubular ou folicular	Tubular ou folicular	–

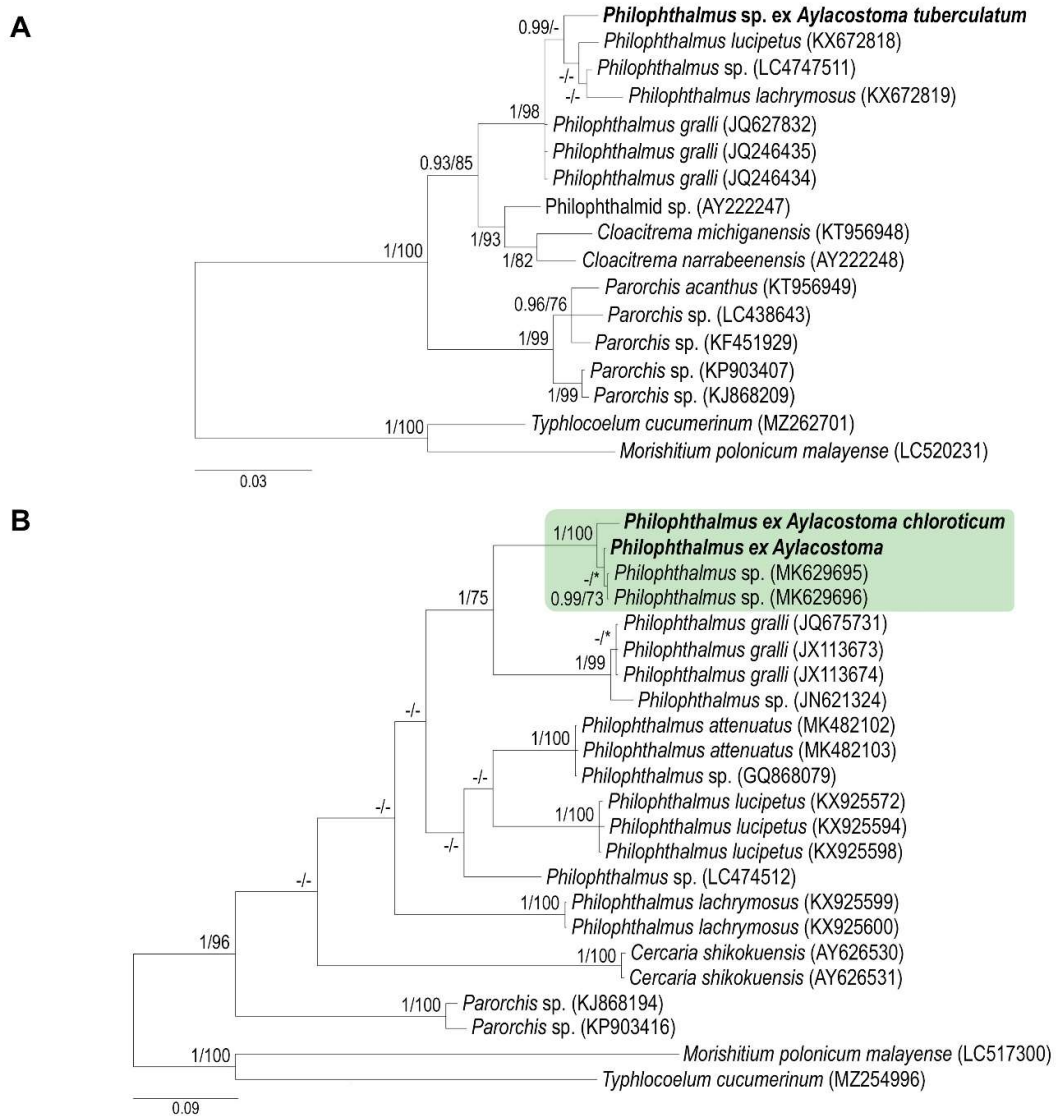


Figura 27 – Árvores filogenéticas obtidas pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para representantes da família Philophthalmidae, inferida através de 28S (903 bp, modelo evolutivo GTR + G) (A) e *cox1* (618 bp, modelo evolutivo HKY + G) (B). Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. (\*) Asteriscos nos nós sinalizam diferenças na topologia recuperada por MV. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.

### 5.3.4 Superfamília Microphalloidea Ward, 1901

#### 5.3.4.1 Microphalloidea gen. sp.

Tipo cercariano: Xifidiocercária.

Hospedeiro intermediário: *A. chloroticum*.

Percentual de infecção total: 0,08% (1/1292).

Local de coleta: Ponto B.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 20/04/2019 (1,19%).

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=20): Larva de cauda simples (Figura 28A). Corpo ovalado, 148 (139–157) × 67 (57–73) (Figura 28B). Presença de três pares de glândulas de penetração ocupando o espaço compreendido entre a ventosa oral e o acetábulo. Ventosa oral arredondada, 30 (28–34) × 29 (27–31). Estilete pequeno, 9,3 (8,4– 10,5) × 3,8 (3,5– 4,3) (Figura 28C). Pré-faringe curta, 11 (9–14). Faringe muscular, 11 (10–12) × 10 (8–11). Ventosa ventral desenvolvida, 24 (21–26) × 23 (20–26), pós-equatorial. Gotículas de gordura (*Fat droplets*). Cauda, 110 (93– 108) × 16 (15– 17) (Figura 28D).

#### *Caracterização molecular*

Foi obtida a sequência parcial de 28S do parasito (1178 bp). Esta foi alinhada com membros da subordem Xiphidiata e analisada filogeneticamente. Na árvore filogenética obtida (Figura 29), foi evidenciado, pelo método de Inferência Bayesiana, que o parasito está inserido no clado contendo representantes da superfamília Microphalloidea. Contudo, não foi verificado agrupamento com nenhuma das famílias incluídas nas análises. Além disso, divergências genéticas elevadas foram verificadas em relação as espécies das famílias Pachysohlidae (12%). Eucotylidae (14% a 18%), Faustulidae (20–23%) e Zoogonidae (18–20%).

*Comentários:* As características morfológicas permitiram a identificação desta larva como do tipo xifidiocercária pela presença de estilete (PINTO; MELO, 2013). Com auxílio do dado molecular foi possível determinar que o parasito pertence à superfamília Microphalloidea. Cercárias apresentando gotículas de gordura no corpo cercariano foram

reportadas em caenogastrópodos nos Estados Unidos (SEITNER, 1945) e Rússia (SHCHENKOV et al., 2020). Contudo, estas larvas se diferenciam por possuir órgão vírgula, e as descritas por Schenkov et al. (2020), molecularmente foram identificadas como representantes da família Pleurogenidae, distante em relação a deste estudo. Outra cercária com gotículas de gordura reportada no trabalho mencionado anteriormente foi identificada como *Cercaria nigrospora*, que não apresenta de órgão vírgula, porém, a disposição das glândulas de penetração (1 par pré-acetabular, 1 par para-acetabular, 1 par pós-acetabular) é diferente da larva reportada no presente estudo (3 pares pré-acetabulares). A diferenciação entre ambas larvas também foi corroborada na análise molecular, encontrando-se inseridos em diferentes clados e com alta divergência genética (11%).

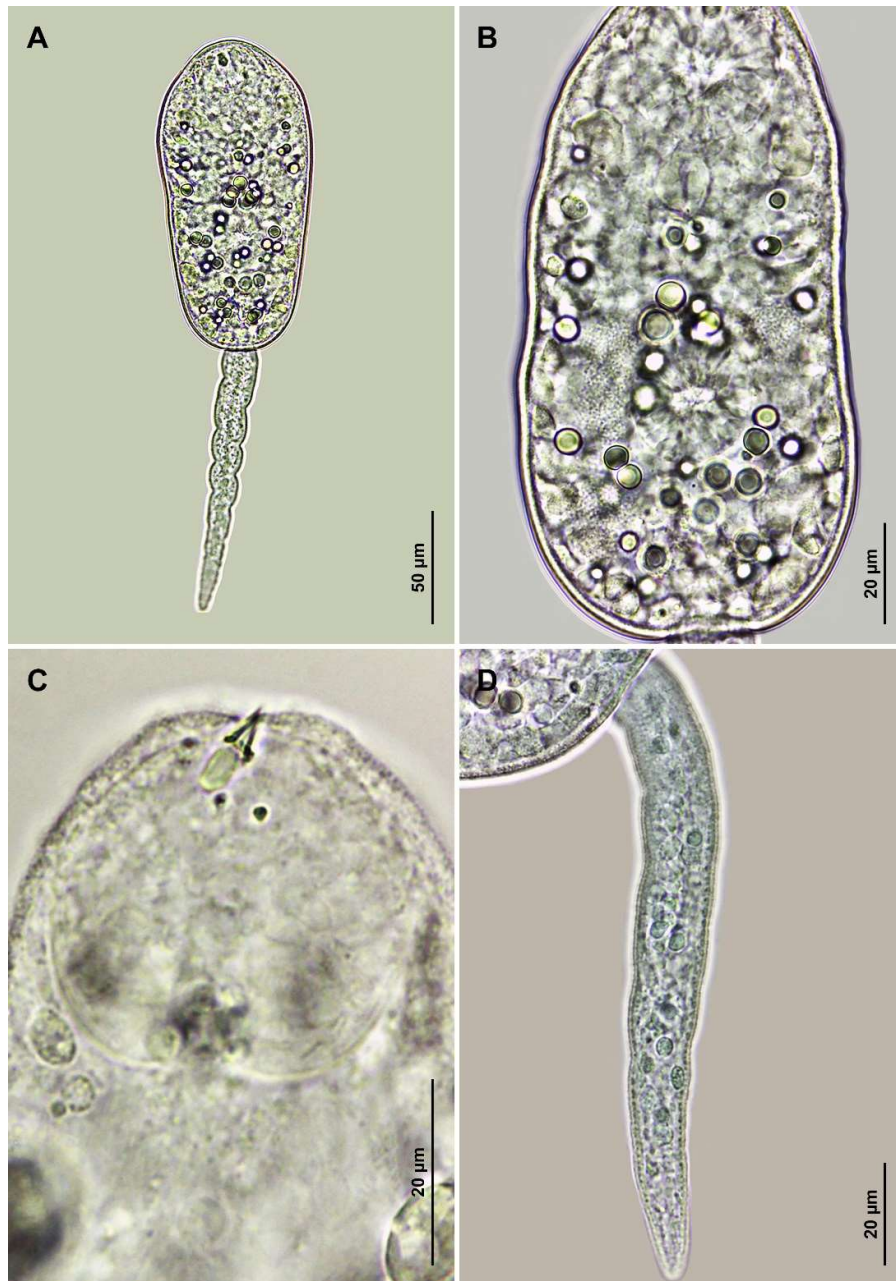


Figura 28 – Microphalloidea gen. sp. (A) Cercária emergida de *Aylacostoma chloroticum* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano corado pelo sulfato azul de Nilo. (C) Detalhe do estilete. (D) Cauda com tegumento liso.

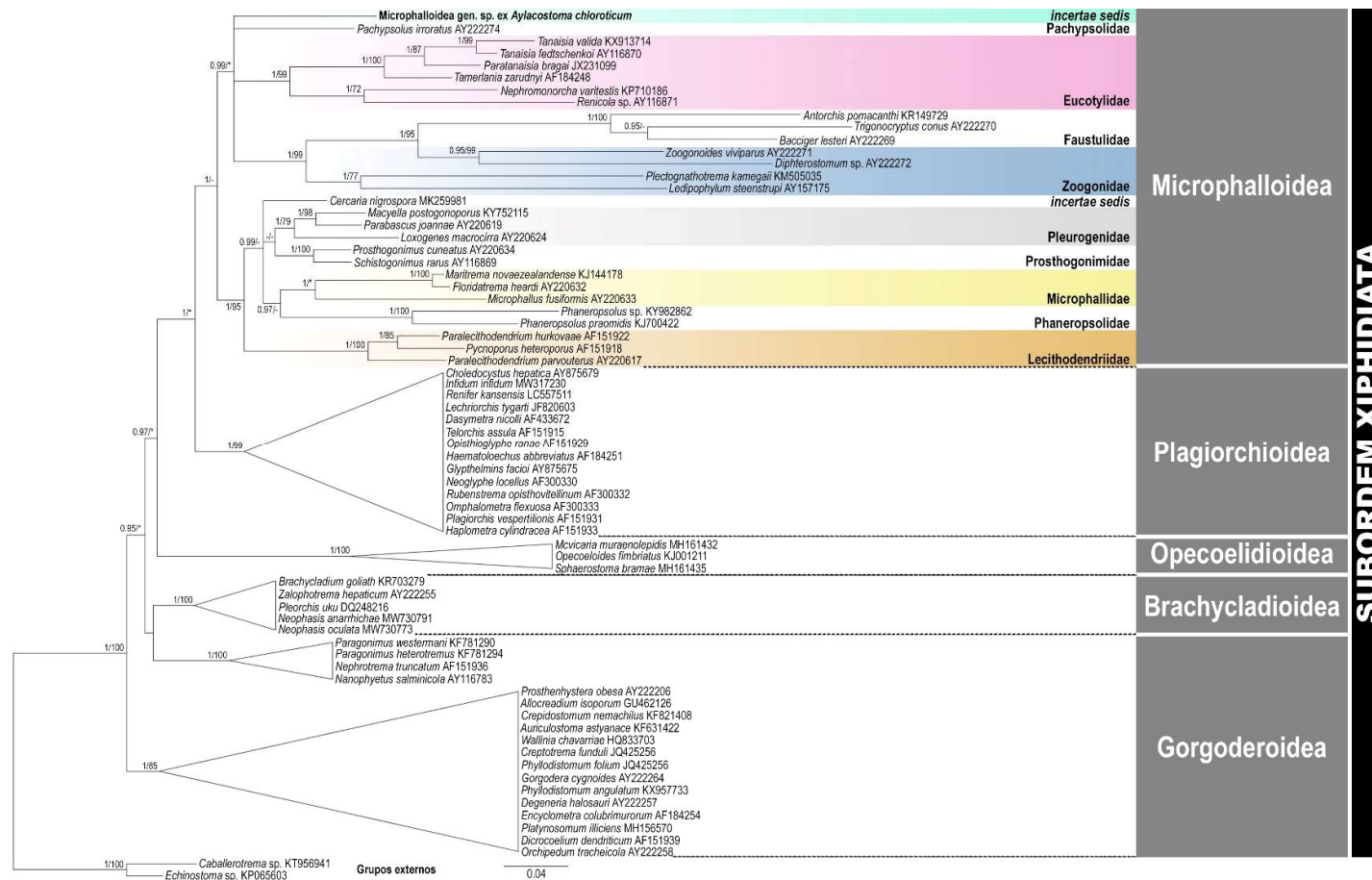


Figura 29 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para representantes da subordem Xiphidiata inferida através de 28S (1186 bp, modelo evolutivo: GTR+G+I). Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. (\*) Asteriscos nos nós sinalizam diferenças na topologia recuperada por MV. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.

### 5.3.4.2 Família Lecithodendriidae Lühe, 1901

#### 5.3.4.2.1 Lecithodendriidae gen. sp. 1

Tipo cercariano: Xifidiocercária.

Hospedeiro intermediário: *A. chloroticum* e *A. tuberculatum*.

Percentual de infecção total: 1,02% (51/5017).

Local de coleta: Pontos A e B.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 31/07/2017 (2,9%); 01/08/2017 (1,46%); 02/08/2017 (0,53%); 31/08/2017 (1,82%); 01/09/2017 (1,79%); 02/09/2017 (0,57%); 06/10/2017 (0,58%); 09/10/2017 (0,56%); 02/02/2018 (1,09%); 28/03/2018 (5,26%); 25/05/2018 (0,56%); 26/05/2018 (0,55%); 28/07/2018 (1,48%); 15/09/2018 (1,71%); 20/10/2018 (0,42%); 22/10/2018 (0,62%); 20/04/2019 (1,54%); 21/04/2019 (3,57%); 25/04/2019 (1,68%); 23/06/2019 (1,89%); 21/07/2019 (2,94%); 22/07/2019 (0,61%); 22/08/2019 (1,94%); 24/08/2019 (0,83%).

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=20): Larva de cauda simples (Figura 30A). Corpo ovalado, 108 (103–112) × 45 (41–49), com tegumento liso (Figura 30B). Ventosa oral subterminal, 26 (24–29) × 26 (24–29), com estilete (16,4 × 4,4) na região anterior. Faringe não desenvolvida. Ventosa ventral rudimentar, 15 (14–16) × 17 (15–18), equatorial. Três pares de glândulas de penetração, as duas primeiras para-acetabular, e a terceira, pós-acetabular. São produzidas por esporocistos ovalados (Figura 30C). Na tabela 22 são apresentadas as medidas da larva junto com as de outras xifidiocercárias semelhantes reportadas por outros autores.

#### *Caracterização molecular*

Foi amplificado um fragmento do gene 28S do parasito (1000 bp). Um alinhamento foi construído, incluindo sequências de representantes superfamília Microphalloidea (Lecithodendriidae, Microphallidae, Phaneropsolidae, Pleurogenidae e Prosthogonimidae). Na árvore filogenética obtida (Figura 32), se evidenciou que o parasito está inserido em um clado bem suportado formado por outros membros da família Lecithodendriidae, porém, em um ramo isolado. As divergências genéticas entre o parasito com as espécies dessa família variaram entre 9,8% e 12%. Na análise filogenética

não foi incluída a sequência de *Paralecithodendrium* sp. encontrada em *Aylacostoma chloroticum* no rio Paraná no Brasil (ONACA et al., 2020) por apresentar menor tamanho (502 bp). Contudo, comparando isoladamente ambos os parasitos, foi detectada uma diferença molecular de 13%.

*Comentários:* A presença de estilete na ventosa oral permitiu identificar preliminarmente o tipo cercariano, xifidiocercária (PINTO; MELO, 2013c). De acordo com Shchenkov et al. (2020), a presença de três pares de glândulas de penetração é característica nas cercárias de Lecithodendriidae e Pleurogenidae. Além disso, é distante de uma espécie relatada recentemente em *Melanoides tuberculata* (LOPES et al., 2020), apesar de apresentarem características morfométricas semelhantes.



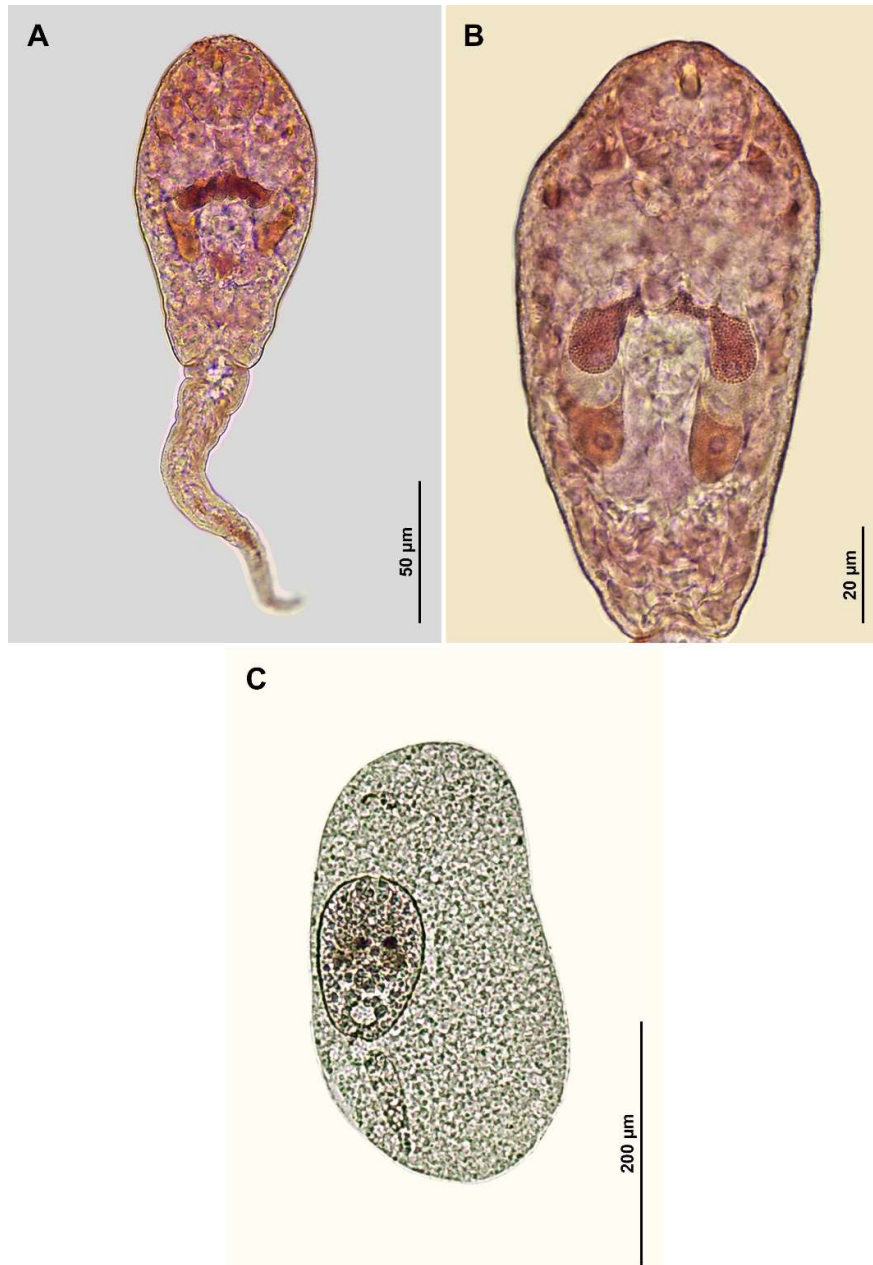


Figura 30 – Lecithodendriidae gen. sp. 1. (A) Cercária emergida de *Aylacostoma tuberculatum* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada pelo vermelho neutro. (B) Corpo cercariano corado pelo vermelho neutro. (C) Esporocisto recuperado de molusco infectado.

### 5.3.4.2.2 *Lecithodendriidae* gen. sp. 2

Tipo cercariano: Xifidiocercária.

Hospedeiro intermediário: *A. chloroticum* e *A. tuberculatum*.

Percentual de infecção total: 0,60% (30/5017).

Local de coleta: Pontos A e B.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 31/07/2017 (1,45%); 02/09/2017 (0,57%); 01/02/2018 (2,18%); 28/03/2018 (5,26%); 25/05/2018 (1,12%); 26/05/2017 (0,55%); 28/07/2018 (0,49%); 22/10/2018 (1,86%); 20/04/2019 (2,56%); 25/05/2019 (1,68%); 23/06/2019 (1,14%); 21/07/2019 (0,74%); 22/07/2019 (0,65%); 22/08/2019 (0,65%); 23/08/2019 (0,24%); 24/08/2019 (0,41%).

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=20): Larva de cauda simples (Figura 31A). Corpo esferoidal, 108 (101–115) × 63 (57–68), com tegumento sem espinhos (Figura 31B). Ventosa oral subterminal, 47 (44–52) × 47 (42–53), com estilete na região anterior (13 × 4,6). Órgão vírgula proeminente, lobulado. Faringe muscular, 11 (9–11) × 10 (8–11). Ventosa ventral rudimentar, 16 (14–18) × 18 (16–19), equatorial. Presença de três pares de glândulas de penetração: primeiro par paracetabular, os dois restantes, pós-acetabulares e levemente lobulados. Cauda menor que o corpo, 83 (75–94) × 16 (14–18), com tegumento coberto com microespinhos finos. As larvas são produzidas por esporocistos ovalados (Figura 31C). Na tabela 22 são comparados os dados morfométricos desta cercária e de outras xifidiocercárias semelhantes reportadas por outros autores.

#### *Caracterização molecular*

Foi obtida uma sequência parcial do gene 28S (1128 bp) para esta larva. Nas análises filogenéticas foi observado que este parasito também se encontra inserido no clado da família *Lecithodendriidae* (Figura 32). Adicionalmente, foi evidenciado que é táxon irmão de *Paralecithodendrium parvouterus* (Bhalerao, 1926), detectando 5% de diferença molecular entre eles. A divergência molecular do presente parasito com *Lecithodendriidae* gen. sp. reportado em *Melanoides tuberculata* no Brasil (LOPES et al., 2020) foi 8,5%. Quando comparada com outras espécies do gênero *Paralecithodendrium* Travassos, 1921 (*P. chilostomum* e *P. longiforme*), a diferença genética foi 8,5-8,6%. Quando comparada isoladamente com a sequência de *Paralecithodendrium* sp. (502 bp)

encontrada em *Aylacostoma chloroticum* no rio Paraná no Brasil (ONACA et al., 2020), foi detectada uma divergência molecular de 1,6%.

*Comentários:* De acordo com Shchenkov et al. (2020), a presença de três pares de glândulas de penetração e órgão vírgula são características gerais das cercárias de Lecithodendriidae e Pleurogenidae. O uso do marcador 28S permitiu determinar a família a qual pertence o parasito (Lecithodendriidae). A complexa taxonomia deste grupo, com a ocorrência de parafilia no gênero *Paralecithodendrium* Odhner 1911, dificulta avançar na identificação até o nível de gênero. A comparação das sequências do presente parasito com *Paralecithodendrium* sp. relatado em *A. chloroticum* no território brasileiro, indicam a proximidade entre ambos isolados. Desafortunadamente, encontrar diferenças morfológicas entre eles não foi possível devido aos autores apresentaram poucos dados (apenas comprimento e largura do corpo cercariano e cauda), e principalmente, pela fixação de larvas intramolusco. Morfologicamente, a cercária do presente parasito é semelhante com a de *Paralecithodendrium dollfusi* (BESPROZVANNYKH, 1990) pelo formato do corpo cercariano (esferoidal), presença de órgão vírgula, três pares de glândulas de penetração e cauda com microespinhos. Porém, a cauda dessa espécie é menor (28-46 vs 126-140).

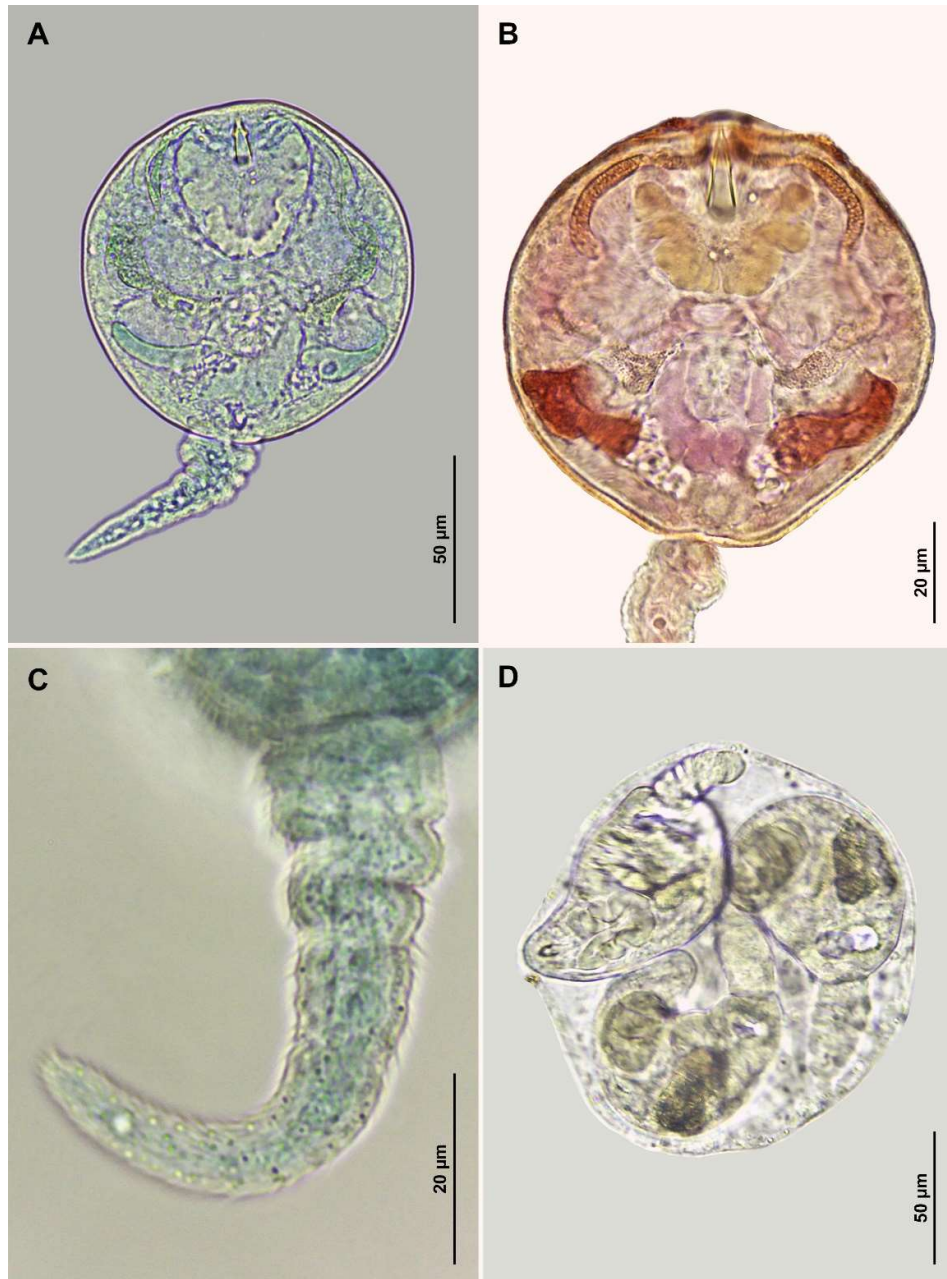


Figura 31 – Lecithodendriidae gen. sp. 2 (A) Cercária emergida de *Aylacostoma tuberculatum* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada pelo sulfato azul de Nilo. (B) Corpo cercariano corado pelo vermelho neutro. (C) Detalhe da cauda com microespinhos. (D) Esporocisto recuperado de molusco infectado.

Tabela 22 – Comparação de dados morfométricos de Lecithodendriidae spp. encontrados no presente estudo com larvas semelhantes reportados por outros autores. C: Comprimento; L: Largura; d: diâmetro.

	Lecithodendriidae gen. sp. 1		Lecithodendriidae gen. sp. 2		Lecithodendriidae gen. sp.		<i>Paralecithodendrium dollfusi</i>	
		Presente estudo		Presente estudo		LOPES et al., 2020		BESPROZVANNYKH et al., 1990
Localidade						Brasil		Rússia
1° Hospedeiro		<i>A chloroticum</i>		<i>A. tuberculatum</i>		<i>Melanoides</i>		<i>Juga</i> sp.
intermediário		<i>A tuberculatum</i>				<i>tuberculata</i>		
Órgão vírgula		Ausente		Presente		Ausente		Presente
Corpo	C	108 (103-112)		108 (101-115)		106 (83-129)		67-93
	L	45 (41-49)		63 (57-68)		54 (40-70)		61-80
Ventosa oral	C	26 (24-29)		47 (44-52)		29 (27-30)		28-36
	L	26 (24-29)		47 (42-53)		30 (29-33)		27-36
Faringe	C	-		11 (9-11)		-		-
	L	-		10 (8-11)		-		-
Ventosa ventral	C	15 (14-16)		16 (14-18)		15 (15-16)		17d
	L	17 (15-18)		18 (16-19)		16 (15-19)		-
Cauda	C	133 (126-140)		83 (75-94)		98 (76-114)		28-46
	L	17 (15-19)		16 (14-18)		17 (14-19)		11-18
Estilete	C	16,4		13		-		14,8
	L	4,4		4,6		-		4,8

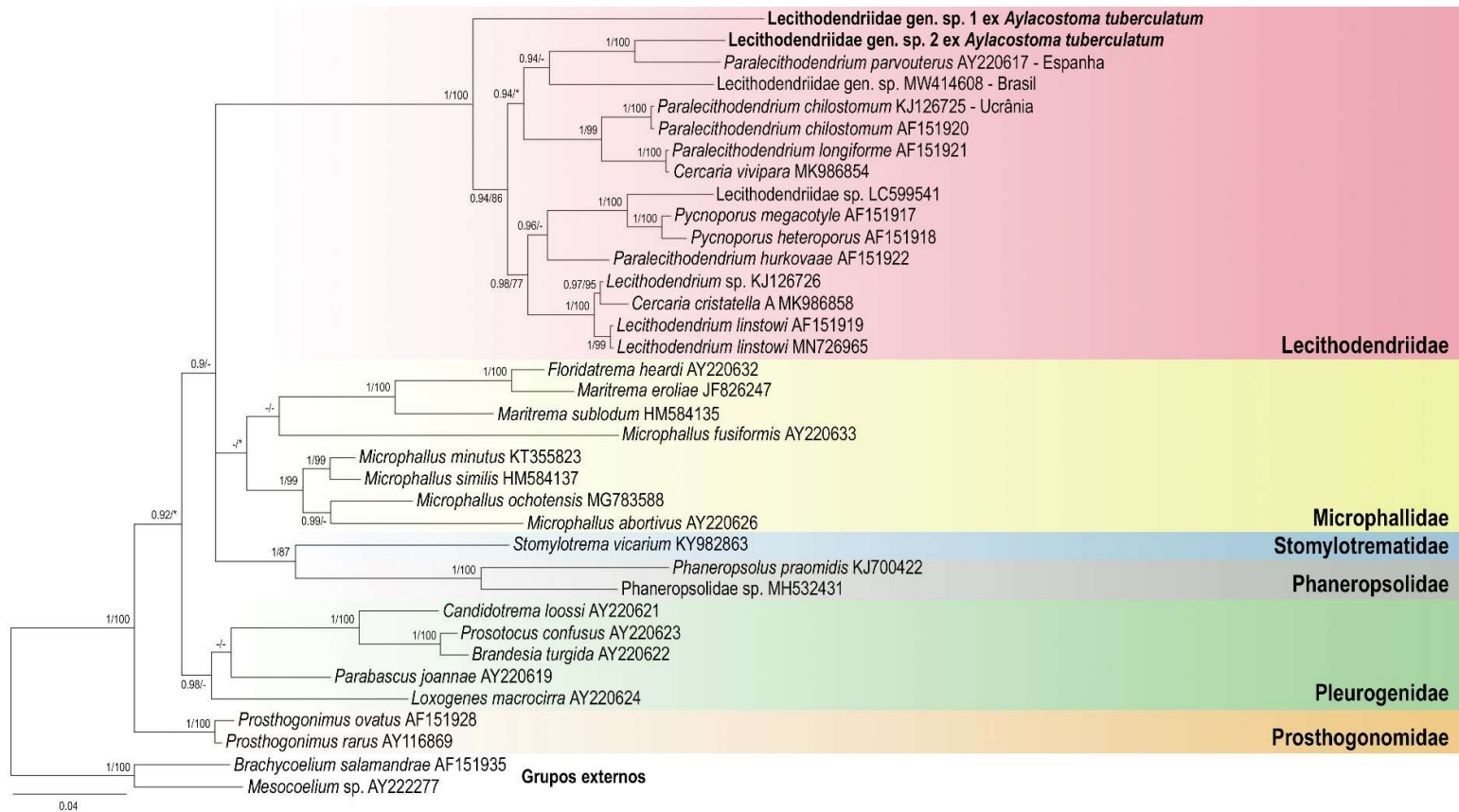


Figura 32 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para alguns membros da superfamília Microphalloidea, inferida através de 28S (987 bp, modelo evolutivo GTR + G + I). Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. (\*) Asteriscos nos nós sinalizam diferenças na topologia recuperada por MV. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.

### 5.3.4.3 Família Phaneropsolidae Mehra, 1935

#### 5.3.4.3.1 Phaneropsolidae gen. sp.

Tipo cercariano: Xifidiocercária.

Hospedeiro intermediário: *A. chloroticum* e *A. tuberculatum*.

Percentual de infecção total: 0,50% (25/5017).

Local de coleta: Pontos A e B.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 02/08/2017 (1,45%); 31/08/2017 (1,36%); 01/09/2017 (0,60%); 02/02/2018 (1,09%); 28/07/2018 (0,49%); 15/09/2018 (0,57%); 20/10/2018 (0,83%); 22/10/2018 (1,24%); 20/04/2019 (0,51%); 21/04/2019 (3,57%); 25/05/2019 (1,68%); 23/06/2019 (0,76%); 22/07/2019 (0,61%); 22/08/2019 (0,65%); 24/08/2019 (0,82%).

Segundo hospedeiro intermediário: Larva de Odonata (Anisoptera) 31/08/ 2017 (4/12, 33,3%); 23/06/2019 (3/8, 37,5%); 22/07/2019 (2/6, 33,3%).

Sítio de infecção: Tecido da região abdominal.

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=20): Larva de cauda simples (Figura 33A). Corpo ovalado, 87 (80–94) × 38 (32–43), com tegumento coberto de microespinhos (Figura 33B). Ventosa oral subterminal, 24 (21–26) × 22 (20–25). Estilete, 18 (16–19) × 3,2 (3–3,7), com extremidade anterior afilada, e posterior, arredondada. Três pares de glândulas de penetração, um par arredondado localizado na região anterior à ventosa ventral, e as duas restantes maiores e lobulares. Cauda cilíndrica, 98 (93–104) × 11 (10–13), com comprimento maior ao corpo cercariano. As larvas são produzidas por esporocistos ovalados (Figura 33C).

Metacercária (n=5): Corpo com formato piriforme ou ovoide, 260 (244–277) × 171 (138–202) (Figura 33D). Ventosa oral ovalada, 53 (47–57) × 66 (57–80). Faringe, 34 × 32. Ventosa ventral, 25 × 30, pré-equatorial. Vesícula excretora em forma de Y, ocupando 53% (47–57) do corpo. A forma larval foi encontrada aderida em tecido esbranquiçado da região abdominal.

### *Caracterização molecular*

Foram obtidos fragmentos de 28S da cercária (1210 bp) e metacercária (1194 bp). As sequências de ambos estágios foram idênticas. Estas foram alinhadas com dados disponíveis para representantes da superfamília Microphalloidea. Na árvore filogenética (Figura 34), foi observado que o parasito se encontra inserido no clado da família Phaneropsolidae, com alto suporte. Além disso, é grupo irmão de Phaneropsolidae sp. reportado na Argentina no molusco *Asolene platae* (DELLAGNOLA et al., 2019), porém, com baixo suporte nodal. A divergência entre ambos parasitos foi de 6,9%. Na comparação com membros da família, as diferenças genéticas variaram entre 8,3% e 11%. Já no caso das outras famílias incluídas na análise, os valores foram maiores (Lecithodendriidae, 14-17%; Microphallidae, 14-15%; Pleurogenidae, 13-15%; Prosthogonimidae, 13-14%; Stomylotrematidae, 13%).

*Comentários:* Inicialmente, devido à presença de três glândulas de penetração na cercária, foi identificado como do tipo “Lecithodendriidae” (família Lecithodendriidae ou Phaneropsolidae) de acordo com Shchenkov et al. (2020). A análise molecular possibilitou determinar que o parasito pertence à família Phaneropsolidae, assim como detectar o segundo hospedeiro intermediário na área de estudo. Recentemente foi reportada uma espécie dessa família na Argentina, no entanto, morfologicamente a larva possui quatro pares de glândulas de penetração e arredondadas e ventosa ventral desenvolvida (DELLAGNOLA et al., 2019). Adicionalmente, as características da metacercária coincidem com algumas da diagnose da família Phaneropsolidae (LOTZ; FONT, 2008), como corpo pequeno e ovoide, ventosa ventral pré-equatorial e vesícula excretora em formato de Y. Contudo, na ausência de relatos de formas larvais desta família, não foi possível uma identificação até o nível de gênero.



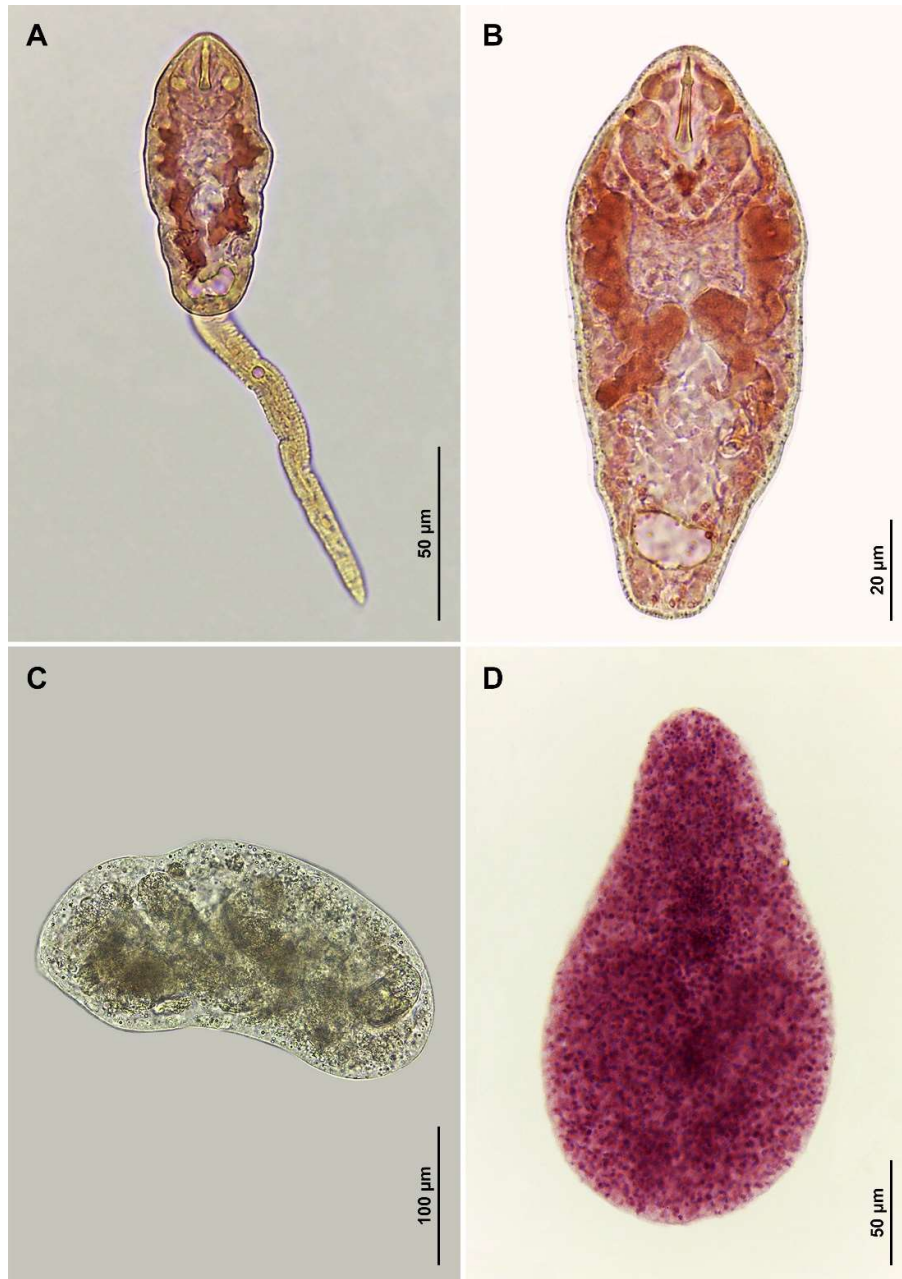


Figura 33 – Phaneropsolidae gen. sp. (A) Cercária emergida de *Aylacostoma chloroticum* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano com vermelho neutro. (C) Esporocisto recuperado de molusco infectado. (D) Metacercária encontrada em larva de Odonata.

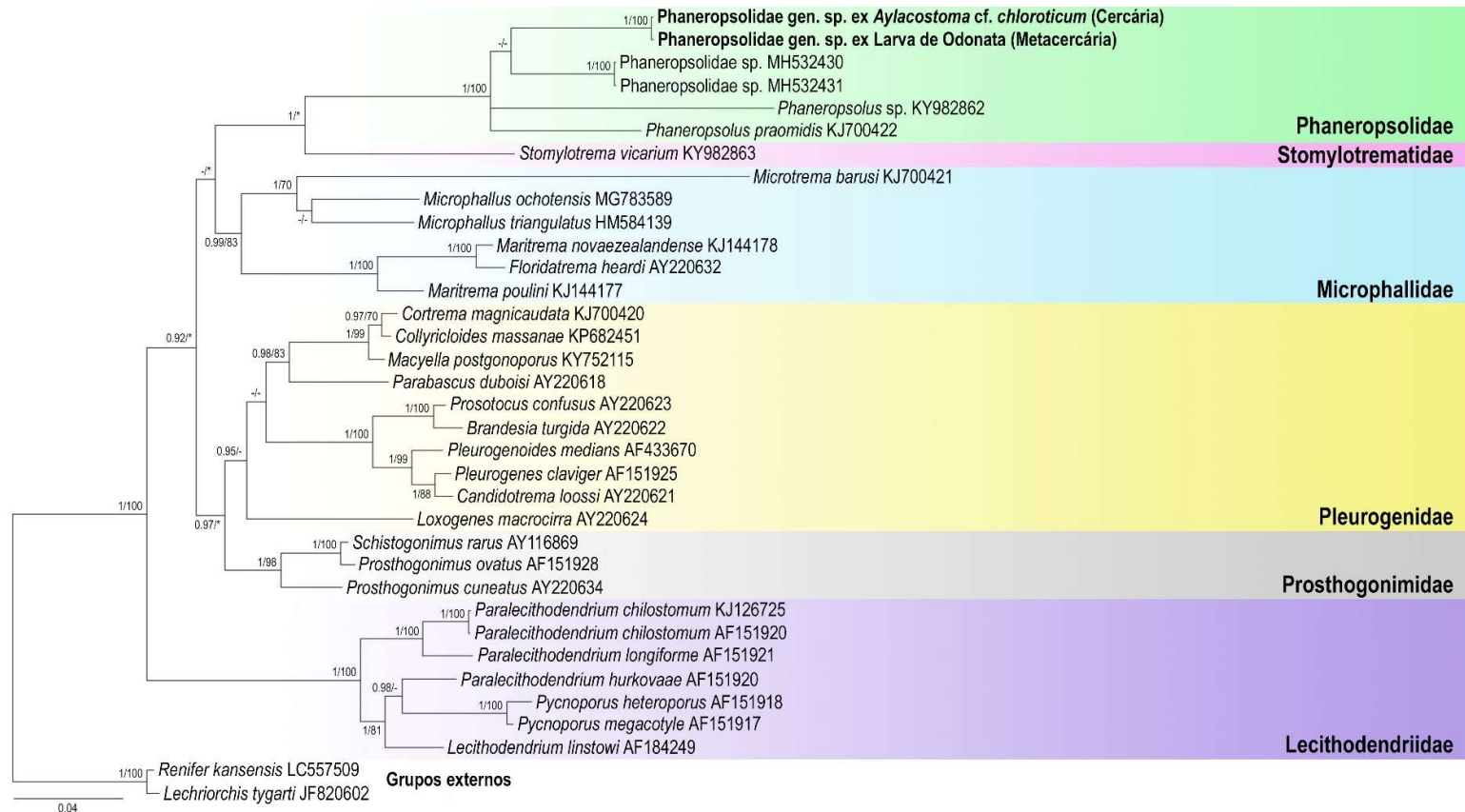


Figura 34 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para alguns membros da superfamília Microphalloidea, inferida através de 28S (1158 bp, modelo evolutivo: GTR + G + I). Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. (\*) Asteriscos nos nós sinalizam diferenças na topologia recuperada por MV. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.

### 5.3.5 Superfamília Opisthorchioidea Looss, 1899

#### 5.3.5.1 Família Cryptogonimidae Ward, 1917

##### 5.3.5.1.1 Cryptogonimidae gen. sp.

Tipo cercariano: Pleurolofocerca com ocelos.

Hospedeiro intermediário: *A. tuberculatum*.

Percentual de infecção total: 0,21% (8/3725).

Local de coleta: Pontos A e B.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 01/08/2017 (0,85%); 28/07/2018 (0,64%); 22/10/2018 (0,63%); 22/07/2019 (3,49%).

Segundo hospedeiro intermediário: *Myleus pacu* (3/4, 75%) (Natural); *Poecilia reticulata* (Experimental).

Sítio de infecção: embaixo das escamas de *P. reticulata*; nadadeira caudal de *M. pacu*.

*Estudo experimental*: 5 exemplares de *P. reticulata* foram expostos a um molusco infectado em um aquário de vidro de aproximadamente 1 L por dois dias. Metacercárias foram detectadas na superfície corporal e aderidas às escamas em dois peixes que morreram aos 7 DPI. No dia 25, foi realizada a necropsia dos demais peixes, sendo detectada a infecção em todos os indivíduos.

##### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=20): Larva com cauda simples (Figura 35A). Corpo, 376 (362–397) × 141 (125–155), com tegumento espinhoso e coloração amarronzada. Par de ocelos pigmentados presentes na região anterior (Figura 35B). Presença de sete pares de glândulas de penetração. Configuração dos ductos das glândulas na região anterior: 3-4-4-3. Ventosa oral subterminal, 73 (68–75) × 49 (41–57). Pré-faringe levemente longa. Faringe muscular, 21 (20–21) × 13, alongada. Bifurcação dos cecos intestinais não evidente pela presença das glândulas de penetração. Primórdio da ventosa ventral pós-equatorial. Vesícula excretora em forma de Y. Cauda, 525 (482–581) × 52 (46–63), com membrana ondulante dorsoventral. Cercárias produzidas por rédias (Figura 35C). Comparações morfométricas da larva são apresentadas na tabela 23.

Metacercária encistada (n=6) (25 dias pós-infecção): Cisto arredondado, 239 (217–264) de diâmetro, com parede cística fina (Figura 35D). Vesícula excretora em forma de Y.

Metacercária desencistada (n=8) (25 dias pós-infecção): Corpo alongado, 631 (542–739) × 169 (155–183), com tegumento espinhoso (Figura 35E, G). Ocelos pigmentados, 9 × 8 (7–10). Ventosa oral terminal, em forma de funil, 80 (76–88) × 69 (59–74). Presença de coroa de 24 espinhos [11,2 (10–12,8) × 4 (3,2–5,3)], ininterrompido no órgão anterior (Figura 35F). Pré-faringe longa, 105 (74–144). Faringe muscular, 52 (48–61) × 35 (31–38), seguida de esôfago, 66 (54–73). Ventosa ventral arredondada, 51 (48–54) × 55 (50–59). Gonotilo presente. Primórdio do ovário ovalado, 30 (21–35) × 32 (26–41), pré-testicular. Primórdio dos testículos, opostos ou oblíquos: Testículo esquerdo, 44 (40–47) × 38 (33–43); testículo direito, 41 (33–47) × 38 (29–43).

#### *Caracterização molecular*

Fragments do gene 28S obtido para a cercária (1279 bp) e metacercária (1230 bp) encontrada em *M. pacu* naturalmente infectado foram obtidos. Ambas sequências apresentaram 100% de identidade e foram incluídas nas análises filogenéticas (Figura 38). Foi observado que o parasito é um membro da família Cryptogonimidae, inserido em um clado com isolados encontrados no Brasil, porém, com baixos valores de suporte. As divergências genéticas com relação a estes parasitos foram 7% e 8,7%, respectivamente. Já com espécies do gênero *Neocladocystis* Manter & Pritchard, 1969 reportados na África (KMENTOVÁ et al., 2020), a diferença molecular variou entre 8,4% e 8,6%.

*Comentários:* A cercária foi identificada como do tipo Pleurolofocerca, com ocelos pigmentados, ausência de ventosa ventral e cauda com membranas natatórias (*fin-folds*) (PINTO, 2019). A larva apresenta medidas maiores que as obtidas para *Neocladocystis* sp. (presente estudo) e *N. intestinalis* (QUINTANA; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2016). A caracterização da metacercária obtida experimentalmente em *P. reticulata*, indicou que apresenta semelhanças com a diagnose do gênero *Annakohniella* (FERNANDES et al., 2013) como: corpo alongado, tegumento espinhoso, ventosa oral em forma de funil com coroa de espinhos, faringe alongada (forma de barril) e ovário pré-testicular. Contudo, o número de espinhos contabilizados na metacercária foi de 24, enquanto *A. travassosi*, única espécie do gênero, possui 22. *Myleus pacu* é aqui registrado como segundo hospedeiro intermediário natural deste parasito.

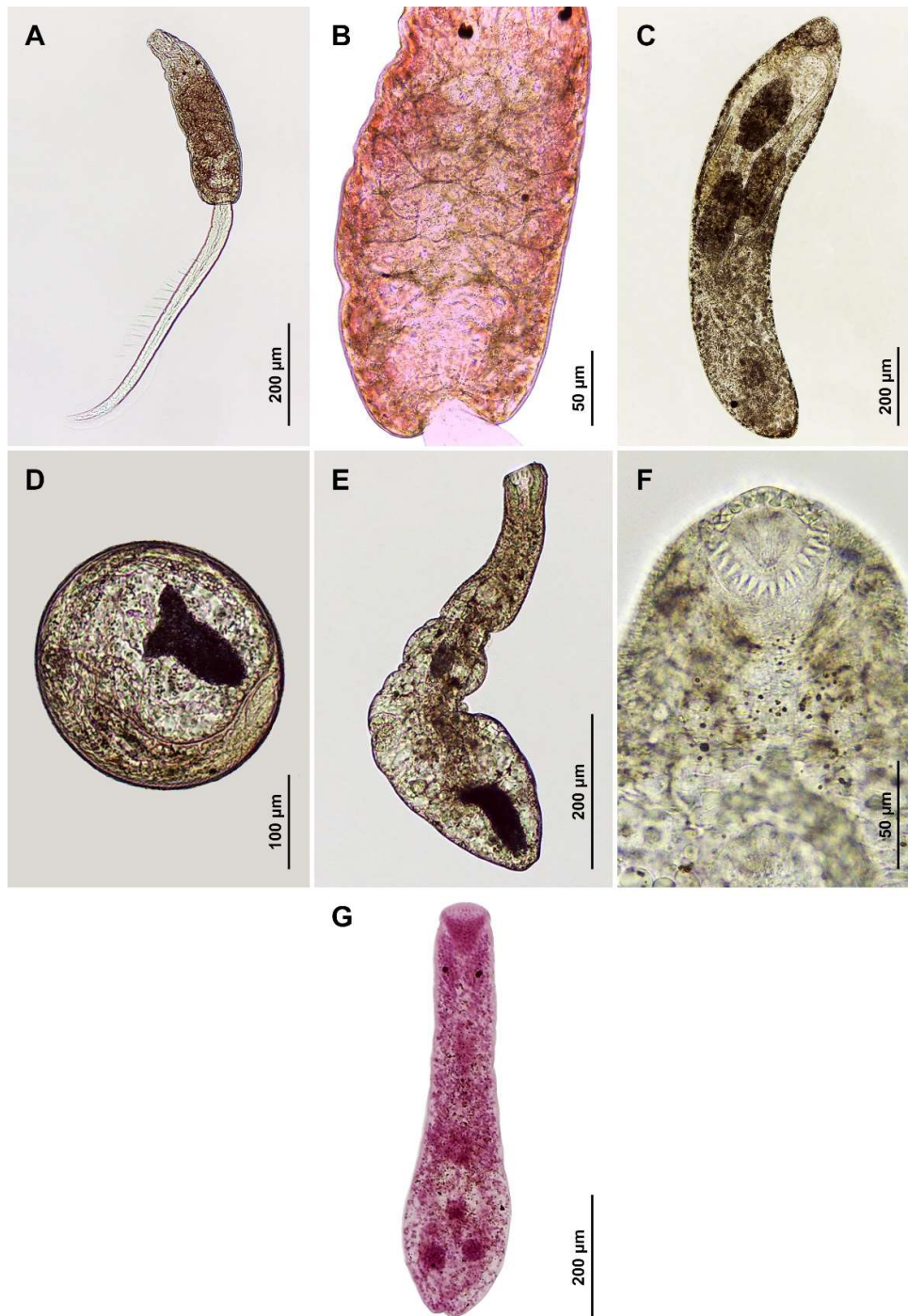


Figura 35 – Cryptogonimidae gen. sp. (A) Cercária emergida de *Aylacostoma tuberculatum* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano corado pelo vermelho neutro. (C) Rédia recuperada de molusco infectado. (D) Metacercária encistada recuperada experimentalmente de *Poecilia reticulata*, 25 dias pós-infecção. (E) Metacercária desencistada. (F) Detalhe da coroa de espinhos na ventosa oral. (G) Metacercária corada pelo carmim.

### 5.3.5.1.2 *Neocladocystis* sp.

Tipo cercariano: Pleurolofocerca com ocelos.

Hospedeiro intermediário: *A. tuberculatum*.

Percentual de infecção total: 0,43% (16/3725).

Local de coleta: Pontos A e B.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 31/07/2017 (1,54%); 01/08/2017 (2,54%); 08/10/2017 (2,94%); 02/02/2018 (0,73%); 22/10/2018 (2,53%); 20/04/2019 (2,47%); 25/05/2019 (2,08%); 23/08/2019 (0,79%); 24/08/2019 (0,79%).

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=15): Larva com cauda simples (Figura 36A). Corpo cercariano relativamente alongado, 177 (161–194) × 77 (69–92), com tegumento espinhoso e com pigmentação amarronzada. Par de ocelos pigmentados localizados na região anterior (Figura 36B). Presença de sete pares de glândulas de penetração. Configuração dos ductos das glândulas na região anterior: 3–4–4–3. Ventosa oral subterminal, 46 (43–50) × 34 (31–40). Pré-faringe longa. Faringe, 11 (10–12) × 10 (9–10). Bifurcação dos cecos intestinais não evidente pelas glândulas de penetração. Primórdio da ventosa ventral pós-equatorial. Vesícula excretora em forma de V. Cauda alongada, 394 (368–415) × 33 (29–38), com membrana ondulante dorsoventral (36C). Na tabela 23 é apresentada a comparação morfométrica com cercária semelhante detectado em *A. chloroticum* na Argentina (QUINTANA; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2016).

#### *Caracterização molecular*

Foi amplificado um fragmento do gene 28S do parasito (1266 bp). Esta foi alinhada com sequências da família Cryptogonimidae, Heterophyidae e Opisthorchiidae, incluindo a obtida para o isolado de *Neocladocystis intestinalis* encontrado em *Salminus franciscanus* no presente estudo. Na árvore filogenética (Figura 38), se evidenciou que o parasito está inserido em um clado contendo os representantes da família Cryptogonimidae com alto suporte nodal. Foi verificada a formação de um clado com *N. intestinalis*, com um alto suporte nodal. Estes isolados diferiram molecularmente em 0,9%. A divergência genética com *Pseudosellacotyla lutzi* variou entre 6,3% e 6,5%. Frente a representantes dos gêneros *Acanthostomum* e *Tanganyikatrema*, as divergências moleculares foram 6,8-7,6% e 8,8%, respectivamente. No caso da comparação com *Neocladocystis* spp.

(KMENTOVÁ et al., 2020) relatados no continente africano, a diferença molecular foi 7,7-7,9%.

*Comentários:* Esta foi a segunda cercária do tipo Pleurolofocerca com ocelos detectada em *A. tuberculatum* neste estudo. Com o uso da sequência de 28S foi determinado que o parasito pertence ao gênero *Neocladocystis*, pelo observado na análise filogenética, com estreita relação com *N. intestinalis* encontrado neste estudo. Morfologicamente, a larva é semelhante à descrita para dito parasito na Argentina (QUINTANA; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2016), mas, distingue-se por apresentar menor comprimento do corpo cercariano.



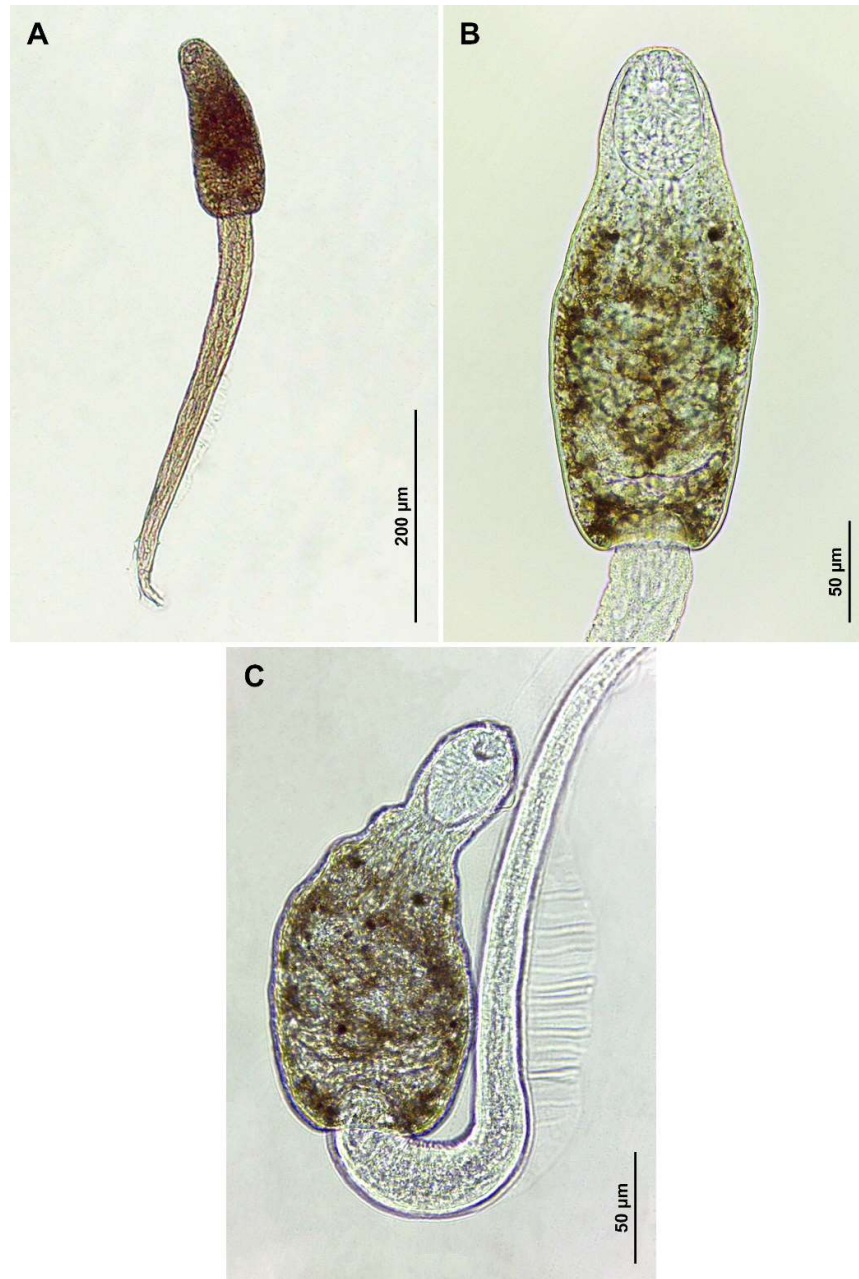


Figura 36 – *Neocladocystis* sp. (A) Cercária emergida de *Aylacostoma tuberculatum* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, fixada em formol. (B) Corpo cercariano corado pelo sulfato azul de Nilo. (C) Detalhe das membranas natatórias na cauda.



Tabela 23 – Comparação de dados morfométricos das cercárias de cryptogonimídeos (com ocelos) encontrados no presente estudo com a detectada em *Aylacostoma chloroticum* na Argentina. C: Comprimento; L: Largura; d: diâmetro.

	Cryptogonimidae		<i>Neocladocystis</i>	<i>Neocladocystis</i>
	gen. sp.		sp.	<i>intestinalis</i>
	Presente estudo		Presente estudo	QUINTANA; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2016 Argentina <i>A. chloroticum</i>
Localidade 1° Hospedeiro intermediário	<i>Aylacostoma tuberculatum</i>		<i>A. tuberculatum</i>	
Corpo	C	376 (362-397)	177 (161-194)	237 (227-246)
	L	141 (125-155)	77 (69-92)	76 (69-82)
Ventosa oral	C	73 (68-75)	46 (43-50)	44 (41-50)
	L	49 (41-57)	34 (31-40)	35 (32-38)
Faringe	C	21 (20-21)	11 (10-12)	13d
	L	13	10 (9-10)	-
Ocelos	C	7 (5-13)	4 (3-7)	
	L	9 (5-13)	6 (3-9)	
Cauda	C	525 (482-581)	394 (368-415)	416 (391-441)
	L	52 (46-63)	33 (29-38)	35 (32-38)

### 5.3.5.1.3 *Pseudosellacotyla lutzii*

Tipo cercariano: Pleurolofocerca.

Hospedeiro intermediário: *A. tuberculatum*.

Percentual de infecção total: 1,91% (71/3725)

Local de coleta: Pontos A e B.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 31/07/2017 (1,53%); 01/08/2017 (6,84%); 02/08/2017 (1,14%); 31/08/2017 (6,80%); 01/09/2017 (1,46%); 05/10/2017 (0,49%); 28/03/2018 (8,33%); 25/07/2018 (1,14%); 28/07/2018 (2,56%); 20/10/2018 (3,36%); 22/10/2018 (3,36%); 21/04/2019 (1,89%); 25/04/2019 (10,42%); 23/06/2019 (0,82%); 21/07/2019 (11,25%); 22/07/2019 (6,29%); 22/08/2019 (3,15%); 23/08/2019 (0,48%); 24/08/2019 (1,58%).

Segundo hospedeiro intermediário experimental: *Poecilia reticulata*.

Hospedeiro definitivo natural: *Hoplias malabaricus*.

*Estudo experimental:* 7 exemplares de *Poecilia reticulata* foram expostos a uma solução contendo 150 cercárias. Aos 7 DPI, os peixes foram observados em microscópio estereoscópio, detectando metacercárias encistadas na nadadeira caudal. No dia 13, foi realizada a necropsia e observou a presença do parasito no hospedeiro experimental.

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=20): Larva com cauda simples (Figura 37A). Corpo, 240 (227–255) × 81 (71–91), com tegumento espinhoso. Presença de sete pares de glândulas de penetração granulados (Figura 37B). Configuração dos ductos das glândulas na região anterior: 3-4-4-3. Ventosa oral subterminal, 34 (30–36) × 33 (27–39). Pré-faringe longa. Faringe de difícil visualização, 12 (9–13) × 13 (11–14). Ventosa ventral rudimentar. Vesícula excretora em forma de V. Cauda, 360 (347–383) × 35 (32–41), com membrana ondulante dorsoventral. São produzidas em rédias (Figura 37C).

Metacercária encistada (n=10): Cisto ovalado, 144 (123–162) × 174 (157–192), com parede cística fina (Figura 37E). As larvas foram encontradas nas nadadeiras, musculaturas, vertebrae e espinhas do modelo experimental (Figura 37D).

Metacercária desencistada (n=13): Corpo ovalado, 171 (159–185) × 137 (118–150) (Figura 37F). Tegumento espinhoso. Ventosa oral subterminal, 36 (33–40) × 47 (43–52). Faringe muscular, 22 (19–24) × 20 (17–22). Esôfago curto. Bifurcação dos cecos pré-acetabular. Ventosa ventral, 20 (17–22) × 21 (19–22), equatorial. Primórdios dos testículos arredondados, pós-acetabulares.

Adulto (n=1): Formato ovalado, 542 × 436 (37G). Tegumento espinhoso. Ventosa oral subterminal, 100 × 121. Faringe muscular, 54 × 52. Bifurcação do esôfago pré-acetabular. Cecos intestinais curtos. Ventosa ventral de difícil observação, 64–67. Dois testículos, ovalados, localizados na metade posterior: testículo esquerdo 121 × 86, testículo direito 121 × 95. Ovário esférico (59, diâmetro), localizado entre os testículos. Vitelária folicular, ovais, conformada em dois grupos localizados ao nível da faringe.

#### *Caracterização molecular*

Foram obtidos fragmentos do gene 28S da cercária (1214 bp) coletada do tiarídeo e da forma adulta de *Pseudosellacotyla lutzii* (975 bp) encontrado em *Hoplais malabaricus*. Foi detectada 100% de identidade entre as sequências de ambos os isolados, e posteriormente, foram incluídas na análise filogenética de Cryptogonimidae gen. sp. e *Neocladocystis* sp. Na reconstrução filogenética (Figura 38), foi observado que o parasito forma um clado com *P. lutzii*, detectando uma divergência genética de 0,4%.

*Comentários:* A cercária foi identificada como do tipo Pleurolofocerca, com ausência de ocelos. As características morfológicas da forma adulta encontrada em *H. malabaricus* concordam com as descritas por Quintana e Ostrowski de Núñez (2014). A análise molecular permitiu a identificação do parasito como *P. lutzii* através da comparação com a sequência de *P. lutzii*, encontrado em *H. malabaricus* no Rio Paraná (PANTOJA et al., 2020). Com relação ao molusco transmissor, no presente estudo foi detectada a infecção exclusivamente em *A. tuberculatum*, enquanto *A. chloroticum* é o responsável da transmissão do parasito no Rio Paraná, na Argentina (QUINTANA; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2014) e no Brasil (ONACA et al., 2020).

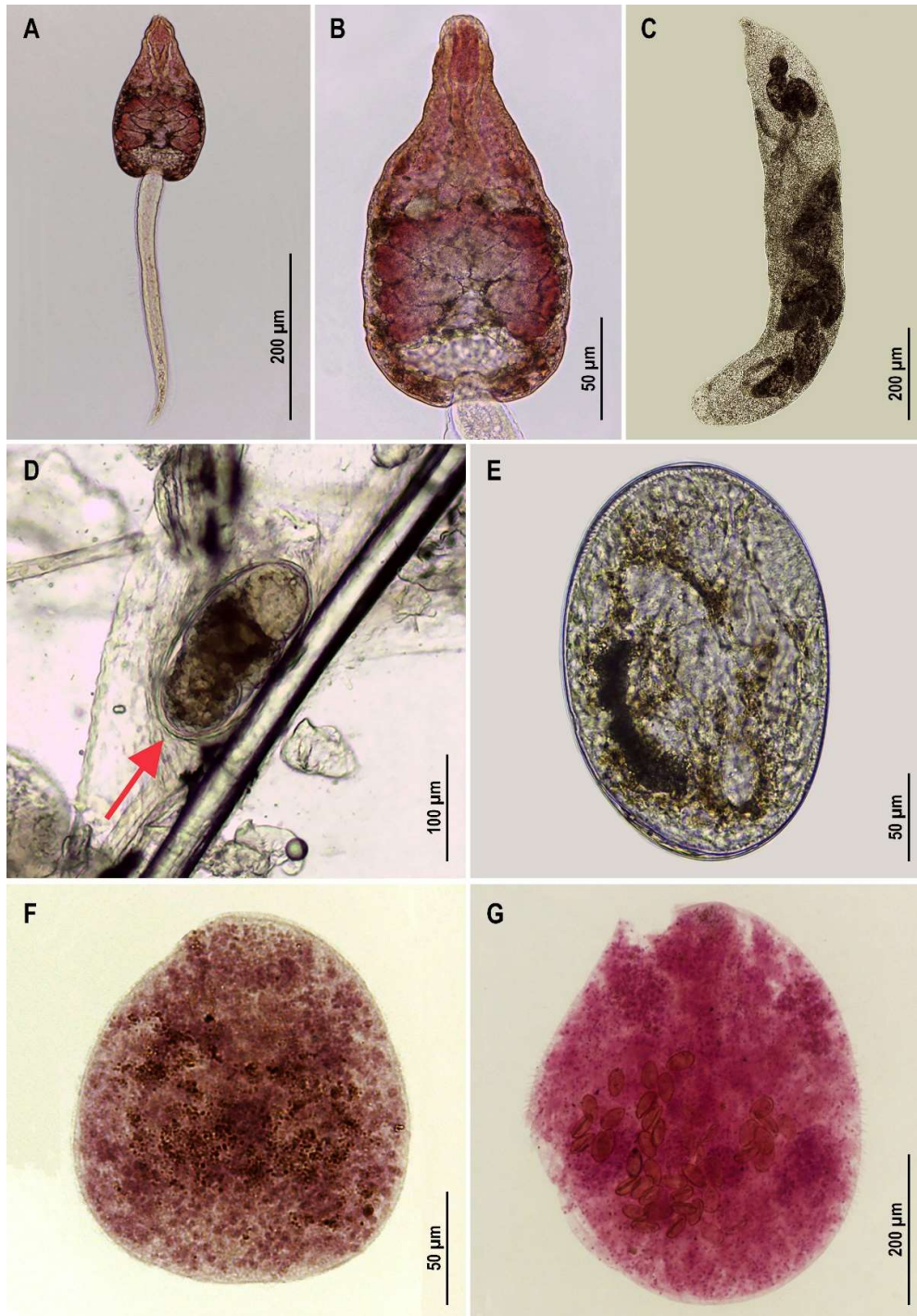


Figura 37 – *Pseudosellacotyla lutzi*. (A) Cercária emergida de *Aylacostoma tuberculatum* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada pelo vermelho neutro. (B) Corpo cercariano. (C) Rédia recuperada de molusco infectado. (D) Metacercária encistada na espinha de *Poecilia reticulata* após 15 de infecção. (E) Metacercária encistada. (F) Metacercária corada pelo carmim aceto-alúmem. (G) Adulto recuperado de *Hoplias malabaricus* naturalmente infectado da área de estudo.

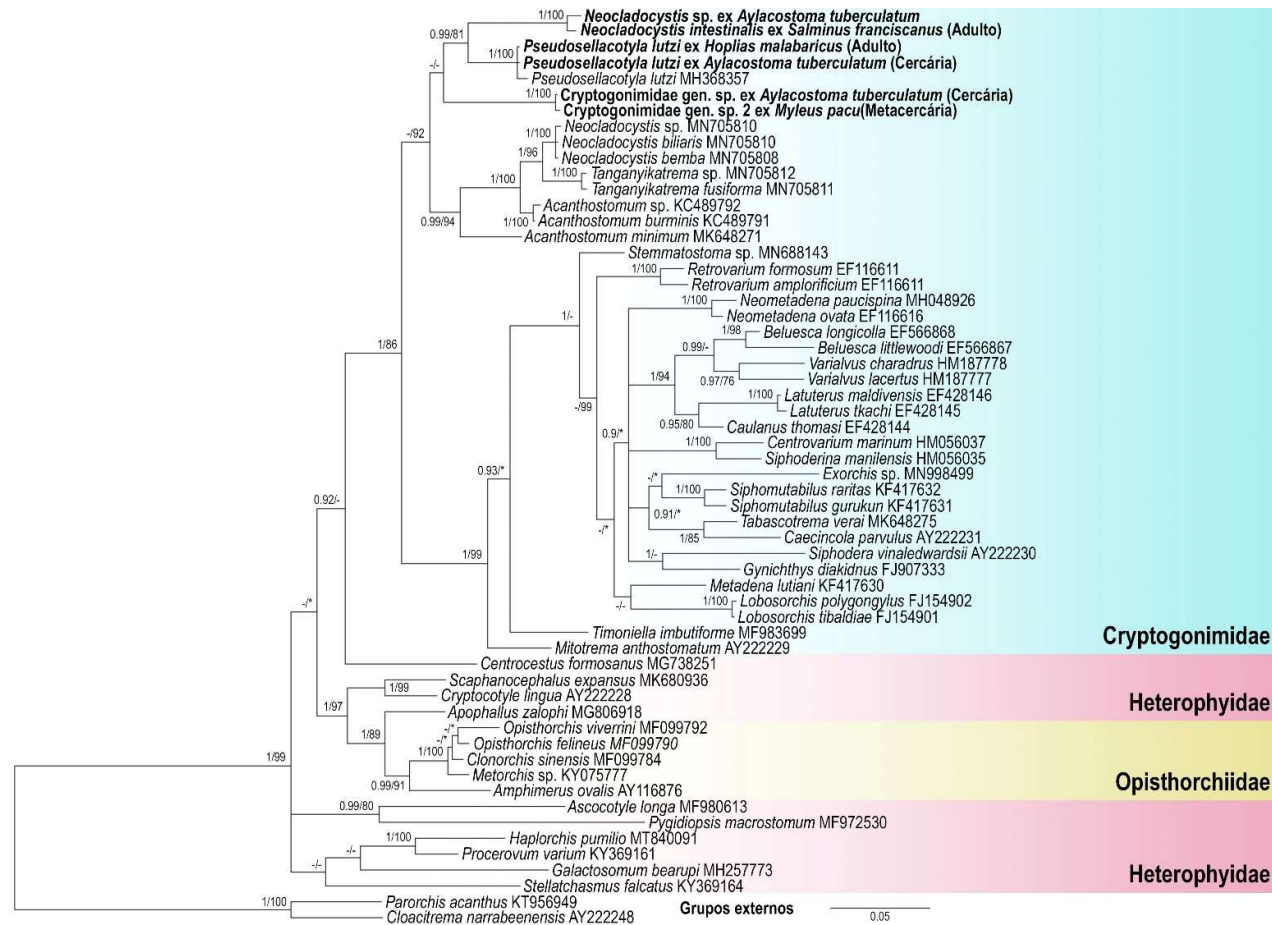


Figura 38 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança para espécies da família Cryptogonimidae, inferida através de 28S (750 bp, modelo evolutivo: GTR + G). Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. (\*) Asteriscos nos nós sinalizam diferenças na topologia recuperada por MV. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.

### 5.3.5.2 Família Heterophyidae Leiper, 1909

#### 5.3.5.2.1 *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924)

Tipo cercariano: Pleurolofocerca.

Hospedeiro intermediário: *Melanoides tuberculata*.

Percentual de infecção total: 0,34% (2/590).

Local de coleta: Pontos A e C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 01/08/2017 (6,67%); 03/02/2018 (1,52%).

#### *Caracterização morfológica*

Cercária: Larva com cauda simples (Figura 39). Corpo piriforme coberto com pequenos espinhos, mais conspícuos na região anterior. Ocelos pigmentados na região anterior do corpo. Células cistogênicas distribuídas em todo o corpo. Ventosa oral subterminal, com 9 espinhos aciculares. Faringe muscular. Presença de sete pares de glândulas de penetração. Vesícula excretora oval, do tipo epitelial. Cauda com anulações transversais no tegumento, com presença de membrana ondulante (*findold*) dorsoventral, pouco evidente.

#### *Caracterização molecular*

Um fragmento do gene 28S (1119 bp) foi obtido para esta larva. Foi verificado 100% de identidade com sequências de *Centrocestus formosanus* disponíveis para comparação.

*Comentários:* Não foram obtidas medidas da cercária pelo resultado molecular e por ser transmitido pelo molusco invasor *Melanoides tuberculata* em diferentes estados do Brasil (PINTO; MELO, 2010; PAULA-ANDRADE et al., 2012; XIMENES et al., 2017).

### 5.3.5.2.2 Heterophyidae gen. sp.

Tipo cercariano: Pleurolofocerca.

Hospedeiro intermediário: *A. chloroticum*.

Percentual de infecção total: 0,08% (1/1292).

Local de coleta: Ponto B.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 06/10/2017 (5%).

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=3): Larva de cauda simples (Figura 40). Corpo piriforme, 188 (173–207) × 74 (71–78), com tegumento espinhoso. Par de ocelos pigmentados, 8 (7–9), próximo da ventosa oral. Presença de células cistogênicas distribuídas no corpo. Ventosa oral subterminal, 35 (33–38) × 27 (26–29). Vesícula excretora em forma de Y. Cauda, 133 (121–144) × 27 (26–29), com membrana ondulante dorsoventral.

#### *Caracterização molecular*

Foi obtida a sequência parcial de 28S (1155 bp) da larva. Esta foi alinhada com sequências de representantes da superfamília Opisthorchioidea. Na reconstrução filogenética (Figura 41), foi evidenciado a ocorrência de parafilia na família Heterophyidae. O parasito em estudo agrupou-se com *Opisthometra planicollis* (Rudolphi, 1819), em um clado com alto valor de probabilidade posterior. A divergência genética entre ambos os táxons foi 5,5%. Adicionalmente, representantes dos gêneros *Ascocotyle* e *Pygidiopsis* formaram parte de outro clado, com diferenças moleculares de 7,2-11% e 13%.

*Comentários:* Esta cercária possui características gerais semelhantes a descritas para diferentes gêneros da família Heterophyidae. Do ponto de vista molecular, foi observada maior proximidade com *O. planicollis*, espécie tipo do gênero *Opisthometra*, reportado em aves na América do Sul (PEARSON, 2008). Outros membros da família Heterophyidae reportados nessa região do continente [*Ascocotyle patagoniensis*, *A. cameliae*, (HERNÁNDEZ-ORTS et al., 2019), *A. longa* e *Pygidiopsis macrostomum* (SANTOS; BORGES, 2017)] agruparam em outros clados e apresentaram significativas divergências moleculares.

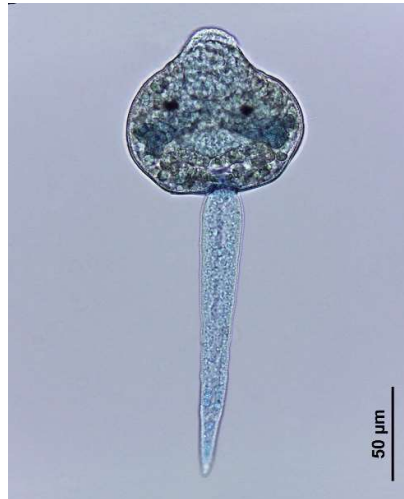


Figura 39 – Cercária de *Centrocestus formosanus* emergida de *Melanoides tuberculata* coletado no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada pelo sulfato azul de Nilo.

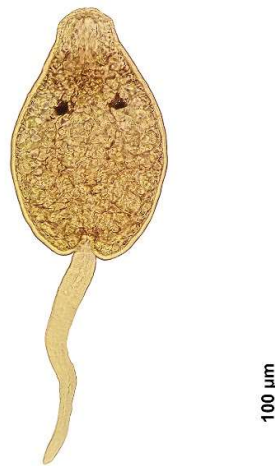


Figura 40 – Cercária de Heterophyidae gen. sp. emergida de *Aylacostoma chloroticum* coletado no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais.



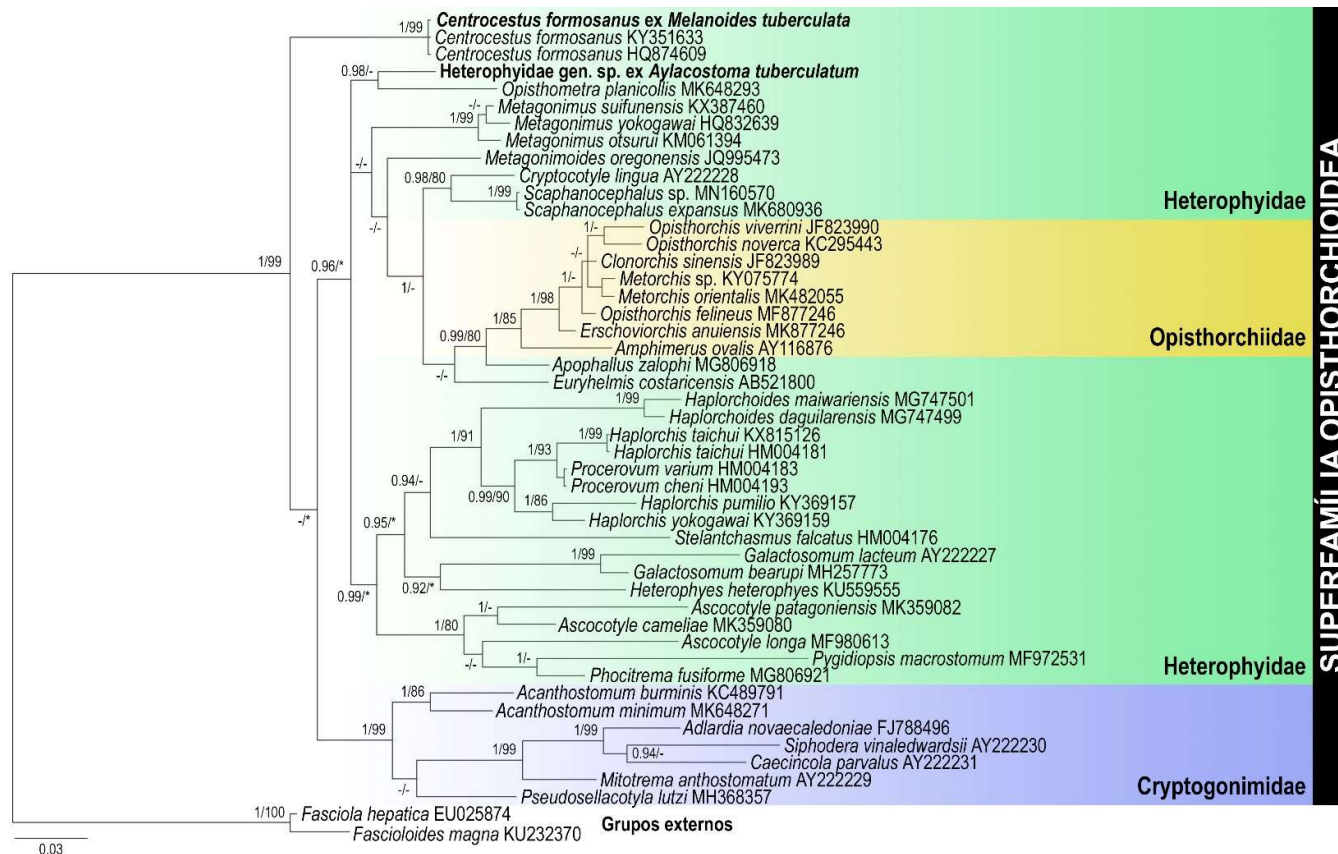


Figura 41 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança de representantes da superfamília Opisthorchioidea, inferida através de 28S (832 bp, modelo evolutivo: GTR + G + I). Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. (\*) Asteriscos nos nós sinalizam diferenças na topologia recuperada por MV. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.

### 5.3.6 Superfamília Plagiorchioidea Lühe, 1901

#### 5.3.6.1 Família Plagiorchiidae Lühe, 1901

##### 5.3.6.1.1 *Choledocystus* sp.

Tipo cercariano: Gimnocéfala.

Primeiro hospedeiro intermediário: Ancylineae gen. sp.

Percentual de infecção total: 3,47% (5/144).

Local de coleta: ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 27/05/2018 (4,17%); 29/05/2018 (4,12%).

*Estudo experimental:* Exemplares de *Poecilia reticulata* foram expostos à uma solução cercariana por 24 horas. Não entanto, as larvas se mantiveram viáveis e não penetraram no modelo biológico.

##### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=16): Larva de cauda simples (42A). Corpo ovalado, 169 (150–180) × 81 (69–92), com tegumento com microespinhos, mais evidentes na região anterior (Figura 42B). Ventosa oral subterminal, 41 (38–51) × 42 (34–51). Pré-faringe curta. Faringe muscular, 19 (17–23) × 14 (13–17). Esôfago longo, com bifurcação na região anterior ao acetábulo. Ventosa ventral arredondada, 43 (38–51) × 48 (45–54), pós-equatorial. Vesícula excretora em forma de Y. Cauda cilíndrica, 173 (146–203) × 28 (23–32), coberta por uma extensiva membrana (Figura 42C). São produzidas por esporocistos alongados (Figura 42D). Comparações morfométricas desta larva e outras semelhantes descritas por outros autores, são apresentadas na tabela 24.

##### *Caracterização molecular*

Foram amplificados fragmentos de 28S (1182 bp) e *cox1* (439 bp) da cercária. A sequência do gene ribossomal foi alinhada com as de membros da superfamília Plagiorchioidea. Na árvore obtida (Figura 43), evidenciou-se que o parasito se agrupou em um clado bem suportado com *Choledocystus hepaticus* (Lutz, 1928) reportado no México (RAZO-MENDIVIL et al., 2011; HERNÁNDEZ-MENA; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, 2019). A divergência genética entre estes táxons foi de 2,5%. Além disso, a

família Plagiorchiidae apareceu como não monofilética, detectando 8,2-8,9% de diferença genética entre *Plagiorchis* spp em relação ao presente parasito. Já com o marcador mitocondrial, a divergência genética entre esta espécie e *C. hepaticus* foi 13%. Além disso, a espécie encontrada em Januária difere em 18% de *Choledocystus incurvatum* (Nasir, 1966), espécie relatada em *Pseudis paradoxa* (Anura) na Argentina (HAMANN et al., 2020).

*Comentários:* Morfologicamente, a cercária encontrada no presente estudo é semelhante às de *Glythelmins hylareus* (MARTIN, 1969) e *G. pennsylvaniensis* (= *Choledocystus pennsylvaniensis*) (SULLIVAN; BYRD, 1970), reportados em *Lymnaea stagnalis* e *Physa gyrina* nos EUA, respectivamente. Contudo, as larvas do parasito aqui reportado apresentam medidas menores. Além disso, os moluscos transmissores destas espécies pertencem a diferentes famílias, Physidae e Lymnaeidae (vs. Planorbidae). Adicionalmente, considerando-se o marcador *cox1*, a diferença entre *Choledocystus* sp. verificada e estas duas espécies norte-americanas foi de 18%. A análise filogenética mostrou maior afinidade com *C. hepaticus*, contudo, as cercárias desta espécie ainda não são conhecidas.

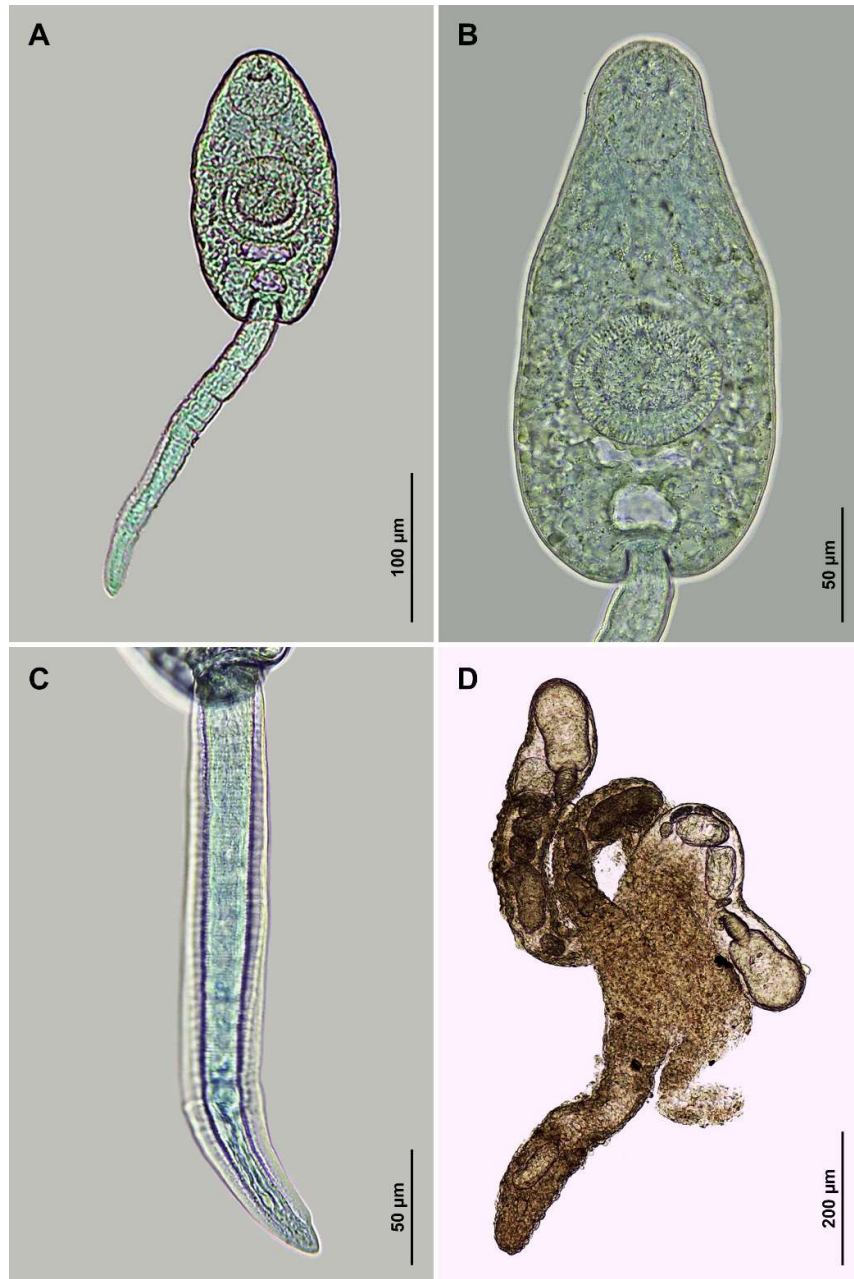


Figura 42 – *Choledocystus* sp. (A) Cercária emergida de Ancylinae gen. sp. coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano com sulfato azul do Nilo. (C) Detalhe da cauda. (D) Esporocistos recuperados de molusco infectado.

Tabela 24 – Comparação morfométrica das larvas de *Choledocystus* sp. e *Glyphelmins* spp. reportados nos Estados Unidos. C: Comprimento; L: Largura.

		<i>Choledocystus</i> sp.	<i>Glyphelmins</i> <i>pennylvaniensis</i>	<i>G. hyllorens</i>
		Presente estudo	SULLIVAN; BYRD, 1970	MARTIN, 1969
Localidade			EUA	EUA
1°		Ancyliidae sp.	<i>Physa gyrina</i>	<i>Lymnaea stagnalis</i>
Hospedeiro intermediário				
Corpo	C	169 (150-180)	300 (270-340)	265 (195-336)
	L	81 (69-92)	130 (130-150)	138 (122-171)
Ventosa oral	C	41 (38-51)	47 (45-51)	60 (54-68)
	L	42 (34-51)	50 (45-60)	64 (54-82)
Faringe	C	19 (17-23)	25 (21-30)	30 (26-34)
	L	14 (13-17)	28 (24-31)	37 (32-44)
Ventosa ventral	C	43 (38-51)	45 (39-48)	71 (50-96)
	L	48 (45-54)	47 (42-54)	79 (66-98)
Cauda	C	173 (146-203)	300 (280-320)	294 (260-323)
	L	28 (23-32)	40	43 (38-56)

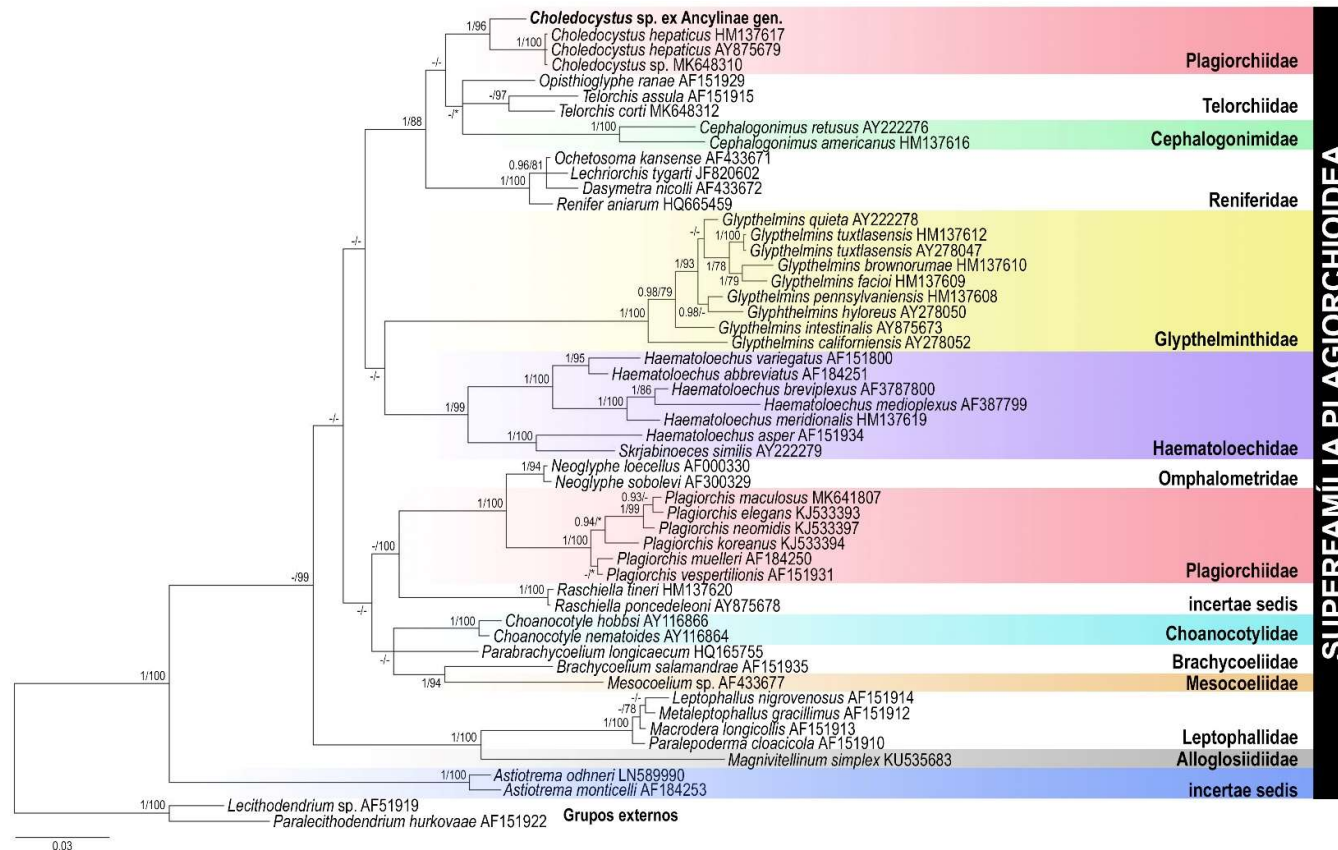


Figura 43 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança de representantes da superfamília Plagiorchioidea, inferida através de 28S (957 bp, modelo evolutivo: GTR + G). Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. (\*) Asteriscos nos nós sinalizam diferenças na topologia recuperada por MV. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.

### 5.3.7 Superfamília Pronocephaloidea Looss, 1899

#### 5.3.7.1 Família Notocotylidae Lühe, 1909

##### 5.3.7.1.1 Notocotylidae gen. sp.

Tipo cercariano: Monostoma.

Hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,04% (2/4806)

Local de coleta: Ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 30/07/2018 (0,23%); 20/07/2019 (0,20%).

##### *Característica morfológica*

Cercária (n=4): Larva de cauda simples (Figura 44A). Corpo, 335 (312–362) × 136 (123–161), com coloração amarronzada. Células cistogênicas presentes em grande número. Par de papilas localizados na região posterior do corpo. Ventosa oral subterminal, 40 (39–43) × 38 (36–41). Faringe e ventosa ventral ausentes. Presença de três ocelos pigmentados na região anterior do corpo, 15 (14–18) × 14, dois laterais e um mediano. Esôfago curto, com bifurcação próximo aos ocelos. Cecos intestinais longos que terminam antes da vesícula excretora. Sistema excretor com dois túbulos coletores que se unem próximo ao ocelo mediano. Cauda cilíndrica, 431 (383–461) × 44 (43–45), com terminação arredondada. São produzidas por rédias de cor amarelada (Figura 44C).

Metacercária (n=14): A larva encista-se rapidamente em substrato sólido. Formato esférico, 155 (143–171) × 125 (109–136) (Figura 44B). Parede cística grossa, 16 (11–23).

Comparações morfométricas da cercária e metacercária com outros representantes da família Notocotylidae descritos por diferentes autores são apresentadas na tabela 25.

##### *Caracterização molecular*

Foi obtida a sequência parcial de 28S (1213 bp) do parasito. Esta foi alinhada com sequências de representantes da superfamília Pronocephaloidea e analisada filogeneticamente. Na árvore (Figura 45), foi evidenciado que o parasito está inserido no

clado da família Notocotylidae, com alto suporte. As divergências em relação a *Pseudocatatropis devoryadkini* e *Quinqueserialis* spp. foram 0,8% e 1,5%, respectivamente. Adicionalmente, na reconstrução filogenética foi observada a formação de um clado onde encontram-se principalmente espécies transmitidas por moluscos pulmonados, com um alto valor de probabilidade posterior (0,96). As diferenças moleculares com essas espécies variaram entre 0,8% e 2%. Por outro lado, foi recuperado um clado formado por espécies dos gêneros *Catatropis* e *Notocotylus*, que incluem várias espécies transmitidas por moluscos prosobrânquios. As divergências moleculares do parasito com os táxons desse clado foram maiores (*Catatropis*, 3,2-3,4%; *Notocotylus*, 2,5-3,2%).

*Comentários:* A larva foi identificada como do tipo cercariano Monostoma de acordo com Pinto e Melo (2013c). Morfologicamente, o corpo cercariano e ventosa oral apresentam dimensões semelhantes com a cercária de *Notocotylus biomphalariae* relatada na Argentina em *B. peregrina* (FLORES; BRUGNI, 2005), no entanto, a cauda é maior nessa espécie. A análise molecular não permitiu definir o gênero ao qual pertence o parasito, com relação próxima com membros de *Pseudocatatropis* e *Quinqueserialis*, e que são transmitidos por moluscos pulmonados. Na comparação morfométrica, a larva de *P. devoryadkini* apresenta uma cauda extremamente curta. Já as cercárias de *Q. quinqueserialis* se diferencia por ter o menor. As metacercárias desta última espécie também são menores. No caso de *Hippocrepis hippocrepis*, cujas larvas foram identificadas em *B. straminea* no Brasil (ASSIS et al., 2019), o corpo cercariano é menor. Na comparação molecular, a divergência frente a *H. hippocrepis* foi de 2%.



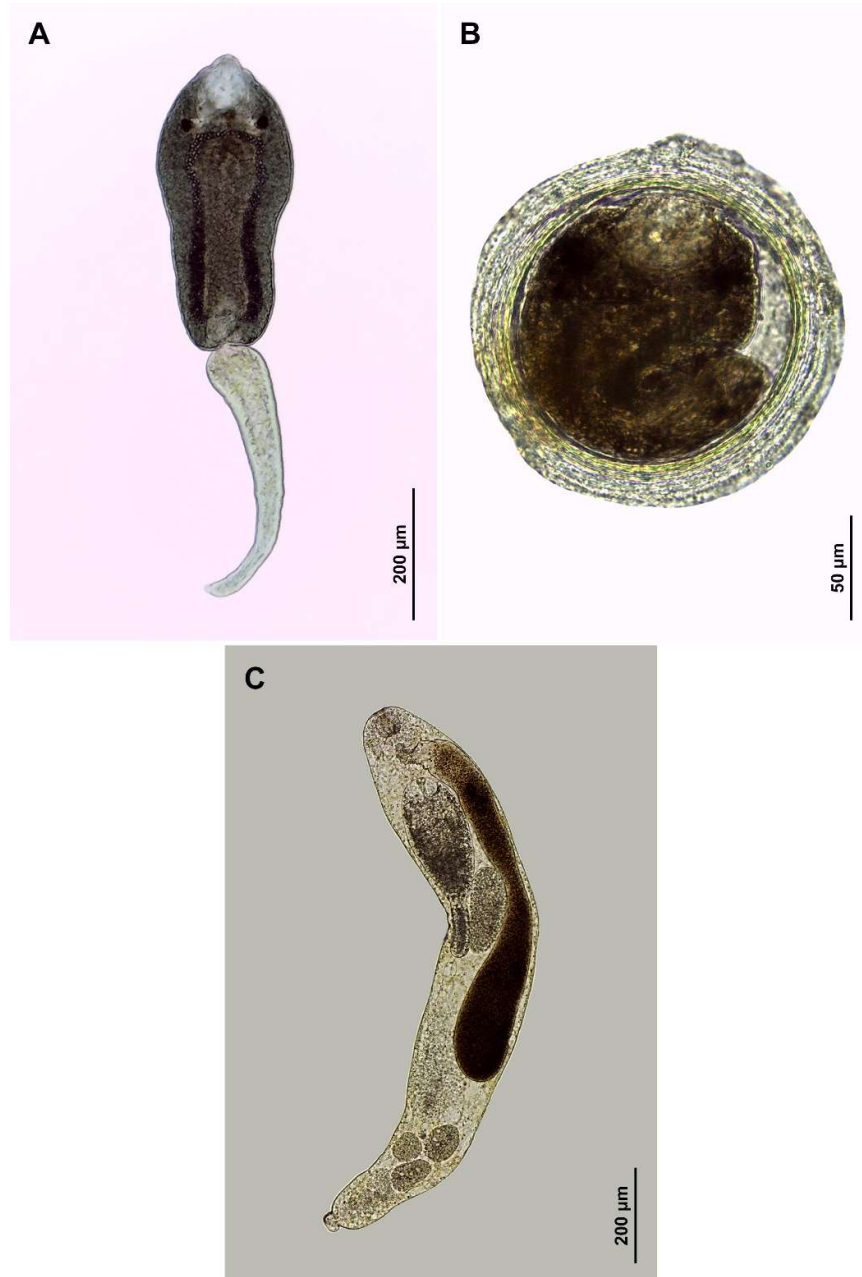


Figura 44 – Notocotylidae gen. sp. (A) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Metacercária encistada. (C) Rédia recuperada de molusco infectado.

Tabela 25 – Comparação morfométrica dos estágios larvais de Notocotylidae gen. sp. e outras espécies da mesma família reportadas por diferentes autores. C: Comprimento; E: Espessura; L: Largura.

		Notocotylidae gen. sp.	<i>Notocotylus biomphalariae</i>	<i>Hippocrepis hippocrepis</i>	<i>Pseudocatatropis dvoryadkini</i>	<i>Quinqueserialis quinqueserialis</i>
		Presente estudo	FLORES; BRUGNI, 2005	ASSIS et al., 2019	IZRAILSKAIA et al., 2019	Herber, 1942
			Argentina	Brasil	Vietnã	EUA
Hospedeiro intermediário		<i>Biomphalaria straminea</i>	<i>B. peregrina</i>	<i>B. straminea</i>	<i>Helicorbis suifunensis</i>	<i>Gyraulus parvus</i>
<i>Cercária</i>						
Corpo	C	335 (312-362)	369 (346-394)	291 (273-314)	231-258	230-280
	L	136 (123-161)	191 (154-221)	132 (109-150)	104-116	130-170
Ventosa oral	C	40 (39-43)	42 (36-53)	41 (37-43)	35-42	-
	L	38 (36-41)	41 (34-50)	41 (38-45)	39-46	-
Ocelos	C	15 (14-18)	-	19 (15-23)	-	-
	L	14	-	19 (15-25)	-	-
Cauda	C	431 (383-461)	702 (634-797)	334 (205-403)	45-62	390-520
	L	44 (43-45)	62 (55-77)	53 (41-68)	-	-
<i>Metacercária</i>						
	C	155 (143-171)	152 (146-158)	146 (137-163)	119-135	160-180
	L	125 (109-136)	-	143 (128-154)	-	-
Parede cística	E	16 (11-23)	14 (10-17)	15 (9-21)	-	-

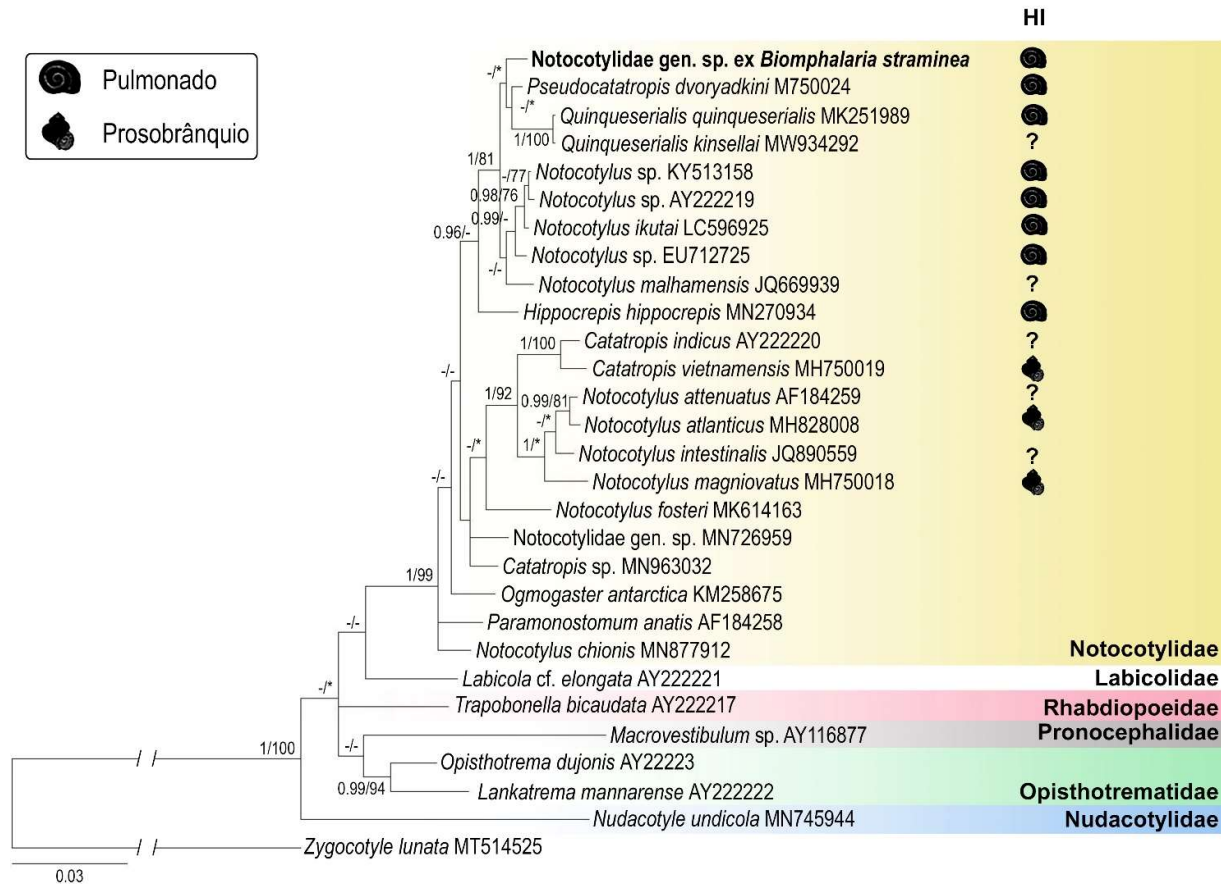


Figura 45 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança de representantes da superfamília Pronocephaloidea, inferida através de 28S (1156 bp, modelo evolutivo GTR + G + I). Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. (\*) Asteriscos nos nós sinalizam diferenças na topologia recuperada por MV. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo. HI: Hospedeiro intermediário.

### 5.3.8 Superfamília Paramphistomoidea Fiscoeder, 1901

#### 5.3.8.1 Família Zygotylidae Ward, 1917

##### 5.3.8.1.1 *Zygotyle lunata*

Tipo cercariano: Anfistoma.

Hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,04% (2/4806).

Local de coleta: Ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 20/07/2019 (0,20%); 20/08/2019 (0,60%)

Hospedeiro definitivo experimental: *Mus musculus*.

*Estudo experimental:* Foi realizada a infecção de dois camundongos através de inoculação oral de metacercárias. Aos 30 DPI, foi realizada a necropsia dos roedores, detectando a forma adulta do parasito no ceco intestinal.

##### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=10): Larva de cauda simples (Figura 46A). Corpo piriforme, 370 (305–454) × 301 (248–347), fortemente pigmentado devido às células cistogênicas que contêm grânulos em forma de barra. Presença de dois ocelos pigmentados, 38 (36–43) × 23 (20–29), localizados na região pré-equatorial. A abertura oral é seguida da faringe, 76 (63–98) × 56 (45–64). A faringe possui dois apêndices posteriores. O esôfago é evidente, com esfíncter. Os cecos intestinais não atingem o extremo posterior do corpo, estendendo-se próximos à vesícula excretora. A ventosa ventral, 103 (89–116) × 118 (107–139), encontra-se na extremidade posterior do corpo. Vesícula excretora arredondada, anterior ao acetábulo. Dutos coletores principais originam-se da margem posterior da vesícula e apresentam divertículos laterais, contendo concreções circulares refratárias e estendem-se até os ocelos. São produzidas por rédias (Figura 46C).

Metacercária (n=11): A cercária encista rapidamente em substrato sólido. Cisto arredondado, 276 (254–304) × 224 (213–236), com parede cística espessa (Figura 46B).

Adulto (n=14): Corpo alongado, 3168 (2871–3566) × 1619 (1391–1747) (Figura 46D). Faringe terminal, 472 (366–549) × 503 (366–556), com um par de divertículos posteriores. Esôfago curto, 250 (190–345) × 98 (84–120), com bulbo esofágico. Cecos intestinais se estendem até o borde anterior da ventosa ventral. Ventosa ventral, 901 (817–993) × 746 (676–810), localizada no extremo posterior, com um uma estrutura (*lip*) no borde posterior. Poro genital próximo da bifurcação do esôfago. Testículos em tandem, lobulados: Testículo anterior, 444 (366–521) × 807 (732–866); testículo posterior, 434 (359–514) × 736 (641–824). Ovário ovalado, 154 (113–225) × 292 (218–359), pós-testicular. Vitelária folicular bilateral. Útero intercecal, pré-testicular.

Ovos (n=20): Ovalados, 141 (131–150) × 71 (64–80), operculados, amarronzados.

*Comentários:* A presença de faringe com projeções, bulbo esofágico e ventosa ventral com um par de papilas nos parasitos adultos estão de acordo com a diagnose do gênero *Zygocotyle* (JONES, 2005). Além disso, as características morfológicas como ventosa ventral terminal com um par de projeções laterais, faringe com divertículos posteriores, presença de bulbo esofágico, testículos lobulados em tandem, e vitelária folicular e extracecal, concordam com as descrições para *Z. lunata* (BARBOSA et al., 2011; OSTROWSKI DE NÚÑEZ et al., 2011). Ressalta-se que Barbosa et al. (2011) detectaram o mesmo hospedeiro intermediário na mesma bacia hidrográfica no estado de Minas Gerais.

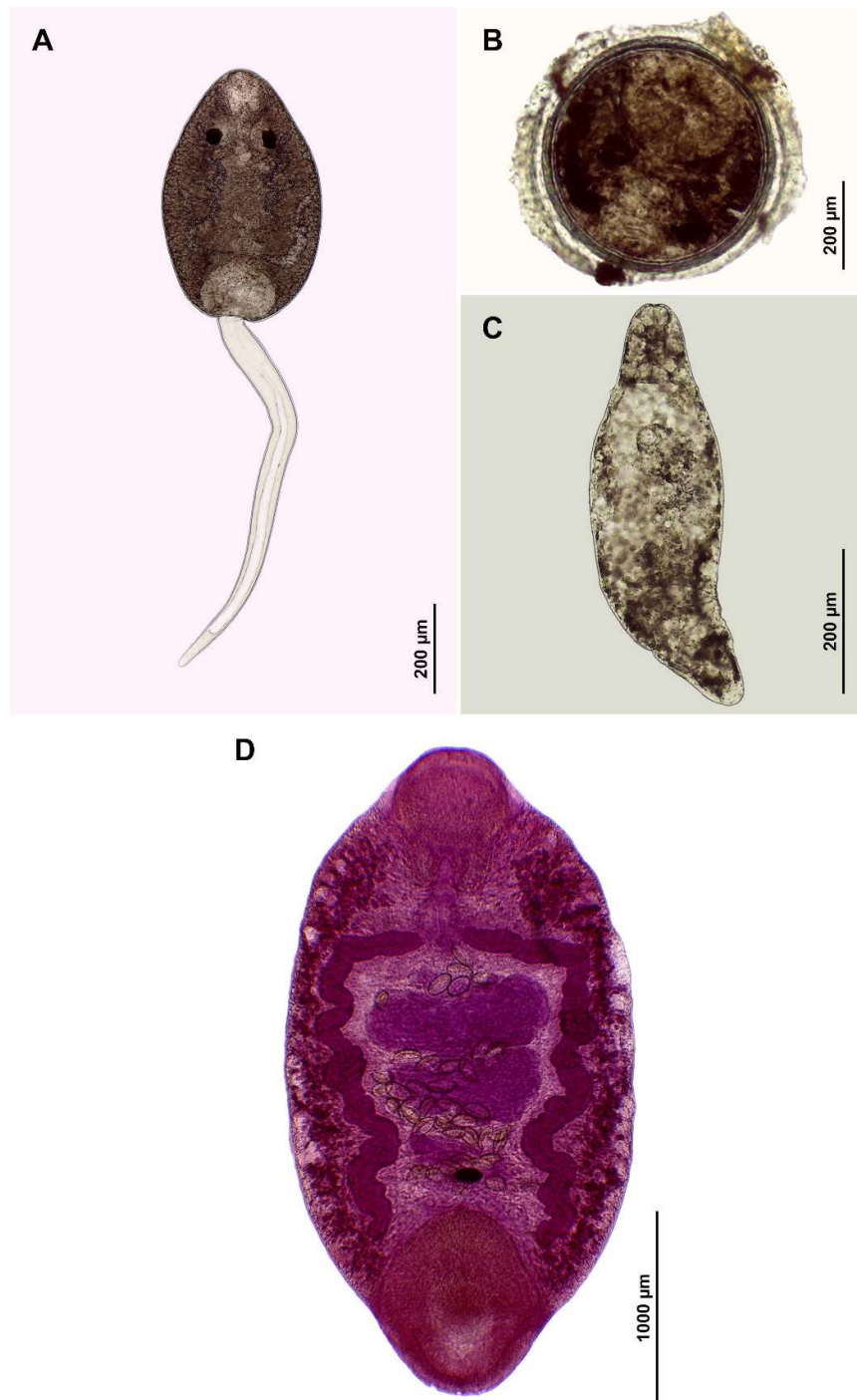


Figura 46 – *Zygocotyle lunata*. (A) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Metacercária encistada. (C) Rédia recuperada de molusco infectado. Parasito adulto obtido experimentalmente em *Mus musculus* 30 dias pós-infecção.

### 5.3.9 Superfamília Schistosomatoidea Stiles & Hassall, 1898

#### 5.3.9.1 Família Aporocotylidae Odhner, 1912

##### 5.3.9.1.1 Aporocotylidae gen. sp. 1

Tipo cercariano: Furcocercária.

Hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,23% (11/4806).

Local de coleta: Ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 29/05/2018 (0,47%); 22/05/2019 (1,97%); 27/05/2019 (2,20%); 19/06/2019 (0,54%); 21/06/2019 (0,48%); 22/06/2019 (0,28%); 17/07/2019 (2,5%).

*Estudo experimental:* 6 exemplares de *P. reticulata* foram expostos à uma solução cercariana. Às 24 horas depois da infecção, um exemplar morreu, sendo observado a região próxima das brânquias levemente avermelhadas. Aos 18 DPI, foi realizada a necropsia dos indivíduos sobreviventes, mas não foi detectada a presença do parasito.

##### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=20): Larva pequena, com cauda bifurcada (Figura 47A). Corpo alongado, 81 (77–86) × 17 (16–20) (Figura 47B). Ausência de membrana ondulante no corpo. Glândulas de penetração não distinguíveis. Órgão anterior, 24 (22–25) × 11 (9–12), protraível, com 7 fileiras de espinhos. Tronco alongado, 149 (140–156) × 13 (12–15), maior que o corpo cercariano, com 6 pares de corpos caudais. Furcas curtas, 43 (40–49) × 6 (5–7) (Figura 47C). Em posição de descanso, foi observada a curvatura dos extremos anterior e posterior do tronco caudal, observando que a emergência das larvas acontece em horário noturno.

##### *Caracterização molecular*

Foi amplificado um fragmento do marcador 28S (1287 bp) do parasito. A sequência foi alinhada com as de membros da família Aporocotylidae, incluindo representantes outras famílias da superfamília Schistosomatoidea, devido à não monofilia da família. Na reconstrução filogenética (Figura 49), foi observado o parasito está inserido em um clado

bem suportado formado por membros da família Aporocotylidae transmitidos em ambientes dulciaquícolas. Contudo a divergência genética com essas espécies variou entre 23% e 24%. Na África, foi relatada a emergência de duas cercárias identificadas como aporocotilídeos em planorbídeos (BRANT et al., 2006). No entanto, divergência genética em relação a espécie aqui caracterizada foi de 22-23%.

*Comentários:* As características gerais da larva, associado ao seu comportamento em posição de repouso, são características compatíveis com larvas de representantes da família Aporocotylidae (MEADE, 1967; NOLAN; CRIBB, 2004), o que permitiu uma identificação preliminar. Isto foi confirmado pela análise molecular, observando uma afinidade com aporocotilídeos relatados em moluscos dulciaquícolas. Morfologicamente, as larvas desse clado apresentaram diferenças. A cercária de *Sanguinicola inermis* Plehn, 1905 distingue-se pela presença de membrana ondulante no corpo cercariano e membranas natatórias nas furcas (KIRK; LEWIS, 1993). *Sanguinicolid* sp. W5003 caracteriza-se por possuir membrana ondulante no corpo e ser transmitido por um tiarídeo na Austrália (BRANT et al., 2006). Já *Sanguinicolid* sp. W5004 foi detectado em um planorbídeo no mesmo país, distingue-se por apresentar 4 pares de pelos proeminentes, perpendiculares ao tronco caudal.



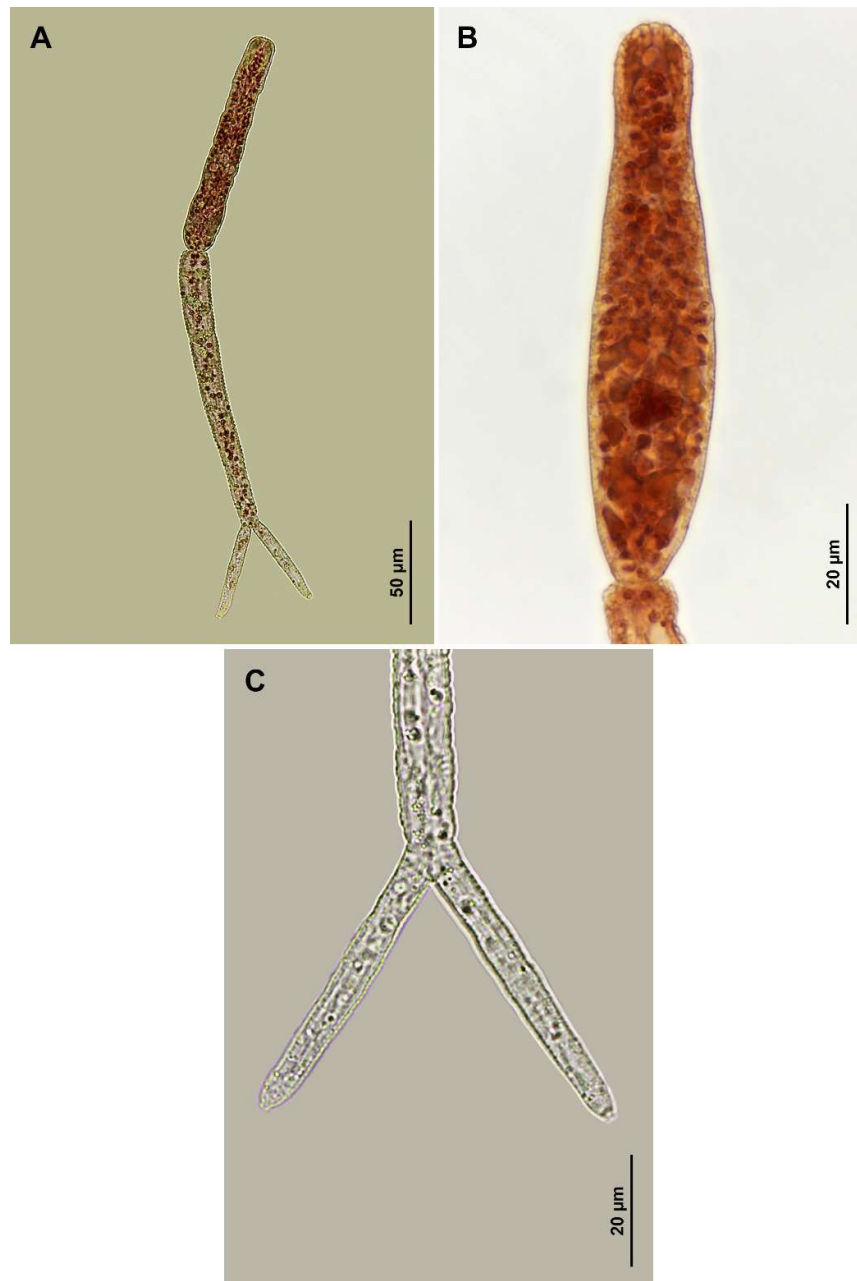


Figura 47 – Aporocotylidae gen. sp. 1. (A) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada pelo vermelho neutro. (B) Corpo cercariano corado com vermelho neutro. (C) Detalhe das furcas.

### 5.3.9.1.2 Aporocotylidae gen. sp. 2

Tipo cercariano: Furcocercária.

Hospedeiro intermediário: *A. tuberculatum*.

Percentual de infecção total: 0,78% (29/3725).

Local de coleta: Pontos A e B.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 31/07/2017 (1,54%); 01/08/2017 (1,71%); 02/08/2017 (5,71%); 02/02/2018 (0,73%); 25/05/2018 (11,35%); 25/07/2018 (2,86%); 22/07/2019 (0,70%); 22/08/2019 (1,58%).

*Estudo experimental*: 6 exemplares de *P. reticulata* foram expostos à solução cercariana. Aos 7 DPI, foi realizada a necropsia dos peixes, mas não foi detectada a presença do parasito.

#### *Característica morfológica*

Cercária (n=20): Larva com cauda bifurcada (Figura 48A). Corpo alongado, 98 (90–108) × 31 (29–35), com tegumento coberto de microespinhos. Presença de 10 pares de glândulas de penetração, as cinco primeiras apresentam conteúdo granular (Figura 48B). Par de ocelos pigmentados, 4 (3–5) × 4 (3–4), localizados na região pós-equatorial. Órgão anterior, 21 (18–24) × 19 (17–22), protraível, coberto com 4 fileiras de microespinhos. Abertura oral próxima da região posterior do órgão anterior. Tronco caudal, 59 (54–69) × 15 (13–19), com tegumento espinhoso, menor que o corpo cercariano. Furcas curtas, 24 (20–26) × 8 (6–9), com membrana natatória (Figura 48C). Em posição de descanso, o tronco caudal forma uma curvatura, permitindo o encontro do corpo cercariano e as furcas. São produzidas por esporocisto ovalados (Figura 48D).

#### *Caracterização molecular*

Foi obtida a sequência parcial de 28S (1203 bp) do parasito, sendo incluída na análise filogenética de Aporocotylidae gen. sp. 1. Na árvore (Figura 49), observou-se que forma uma clado com outros aporocotilídeos transmitidos exclusivamente por moluscos de água doce, com um forte suporte. A divergência genética entre o parasito e *S. inermis* foi de 22%.

*Comentários:* A presente cercária inicialmente também foi identificada do tipo característico da família Aporocotylidae, como mencionado para Aporocotylidae gen. sp. 1. Essa categorização foi confirmada pela análise molecular. Pela análise de Inferência Bayesiana, foi evidenciada proximidade com *Sanguinicola inermis*. No entanto, a cercária dessa espécie não possui um par de ocelos pigmentados (KIRK; LEWIS, 1993). No caso da comparação com Sanguinicolid W5003, detectado em *Thiara balannensis* na Austrália (BRANT et al., 2006), o presente parasito distingue-se por possuir membranas natatórias nas furcas e não apresentar membrana ondulante no corpo cercariano. Morfologicamente, o parasito se assemelha a uma cercária encontrada no tiarídeo *Sermyla riqueti* na Tailândia (NAMCHOTE et al., 2015) e identificada como *Apharyngostrigea pipientis*. Entretanto, trata-se de uma identificação errônea, tendo em vista que a morfologia das cercárias desta espécie da família Strigeidae é bastante diferente (tronco caudal com maior largura que o corpo cercariano) (LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019).

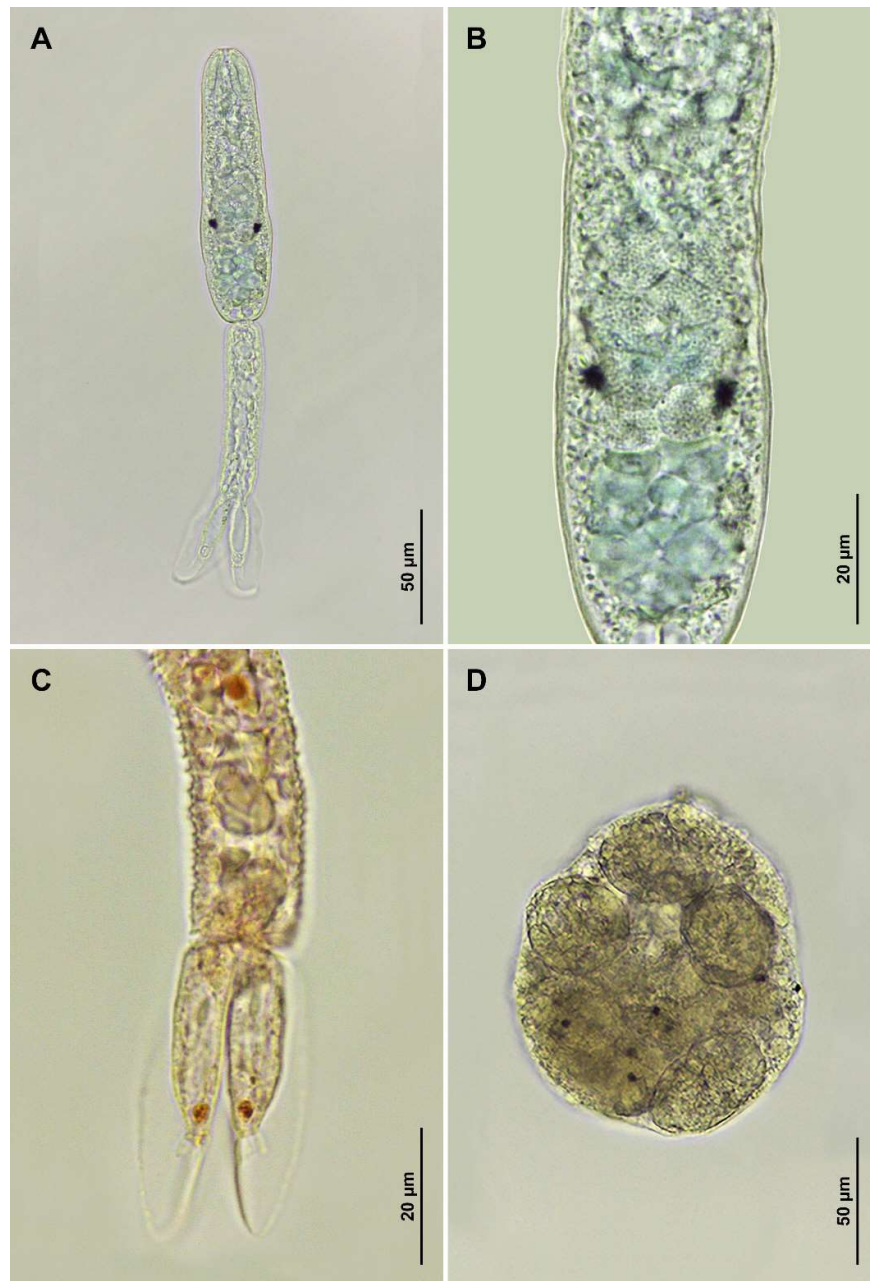


Figura 48 – Aporocotylidae gen. sp. 2. (A) Cercária emergida de *Aylacostoma tuberculatum* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada pelo sulfato azul de Nilo. (B) Corpo cercariano. (C) Detalhe das furcas coradas por vermelho neutro. (D) Esporocisto recuperado de molusco infectado.

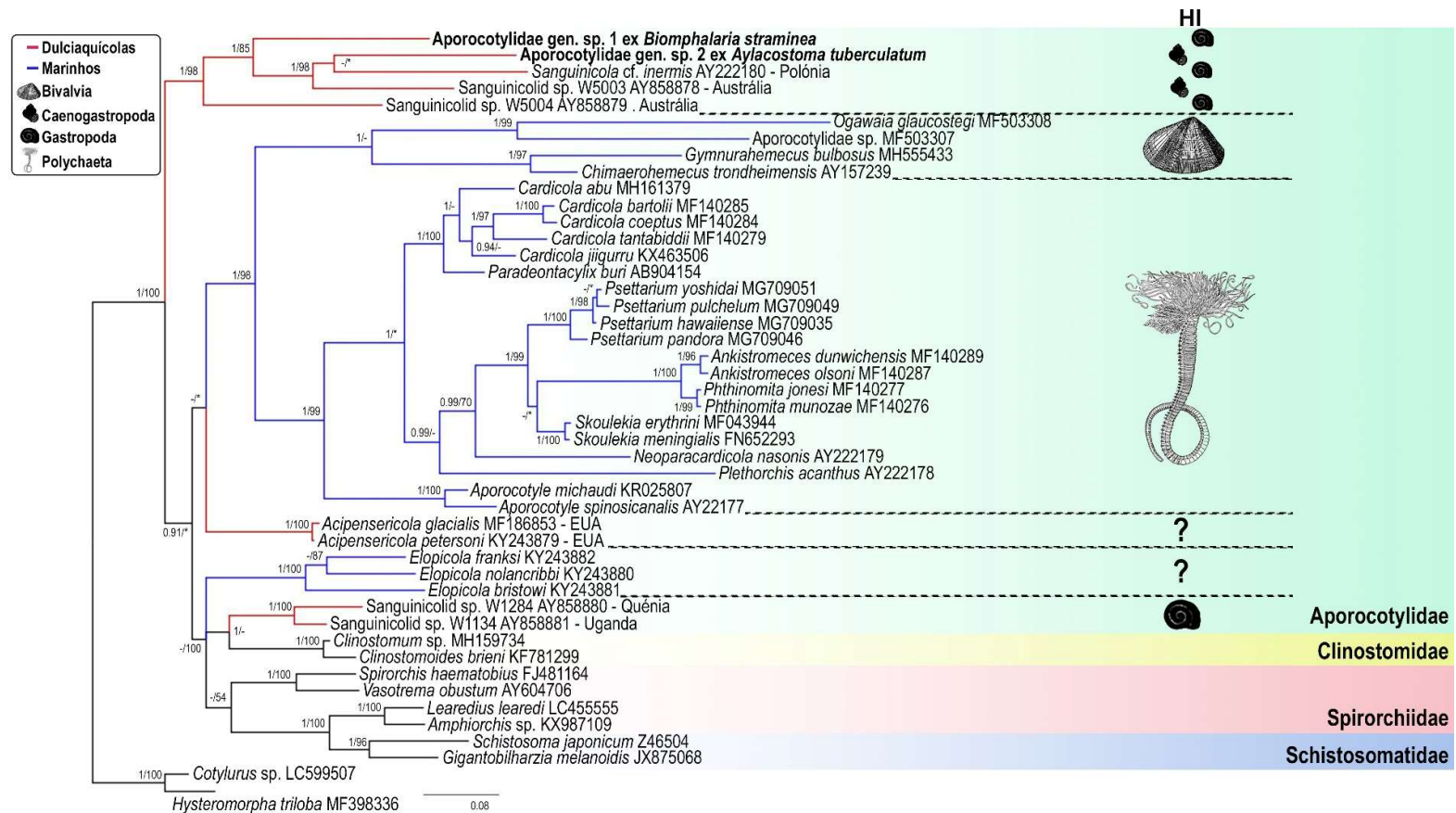


Figura 49 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança de representantes da família Aporocotylidae, inferida através de 28S (1217 bp, modelo evolutivo: GTR + G + I). Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. (\*) Asteriscos nos nós sinalizam diferenças na topologia recuperada por MV. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo. HI: Hospedeiro intermediário.

### 5.3.9.2 Família Schistosomatidae Stiles & Hassall, 1898

#### 5.3.9.2.1 Schistosomatidae gen. sp. 1

Tipo cercariano: Brevifurcada.

Hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,02% (2/4806).

Local de coleta: Ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 29/07/2018 (0,47%); 11/09/2018 (0,22%).

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=7): Larva com cauda bifurcada (Figuras 50A). Corpo alongado, 219 (206–240) × 59 (57–67) (Figura 50B). Par de ocelos, 5 × 5, localizados na região anterior. Presença de cinco pares de glândulas de penetração, duas delas pós-acetabulares. Órgão de penetração ovalado, 72 (66–78) × 40 (36–43). Ventosa ventral, 16 (16–17) × 18 (17–19), equatorial. Furcas, 205 (183–221) × 21 (19–22), com membranas natatórias dorsoventrais, sem espinhos. Na tabela 26 são apresentadas as comparações morfométricas da larva obtidas com outras semelhantes descritas no continente americano.

#### *Caracterização molecular*

Um fragmento do gene 28S (984 bp) foi obtido para este parasito. A sequência foi alinhada com representantes da família Schistosomatidae, principalmente com os reportados em aves ou formas larvais com ocelos pigmentados. O alinhamento foi submetido a análise filogenética pelo modelo evolutivo GTR + G. Foi verificado que a sequência do parasito apresentou 100% de identidade com Schistosomatidae sp. 1, detectado em *B. glabrata* na cidade de Januária por Pinto et al. (2017). Na reconstrução filogenética (Figura 52), observou-se que é grupo irmão de esquistossomatídeo transmitido pelo planorbídeo *Gyraulus parvus* nos Estados Unidos, com alto suporte. A divergência genética com esse esquistossomatídeo variou entre 3,6% e 3,9%. Adicionalmente, foi amplificada a sequência correspondente a ITS1-5.8S-ITS2, detectando 100% de identidade com Schistosomatidae sp. 1.

*Comentários:* As medidas deste parasito são semelhantes às descritas por Pinto et al. (2017) a partir de cercárias encontradas em *B. glabrata* na mesma cidade (Distrito de São Joaquim, distante cerca de 95 km do centro de Januária). Molecularmente, foi possível determinar que ambos os isolados correspondem a um esquistossomatídeo de ave. Trata-se de um membro de um novo gênero que aguarda a obtenção de parasitos adultos para a descrição como proposto por Pinto et al. (2017).

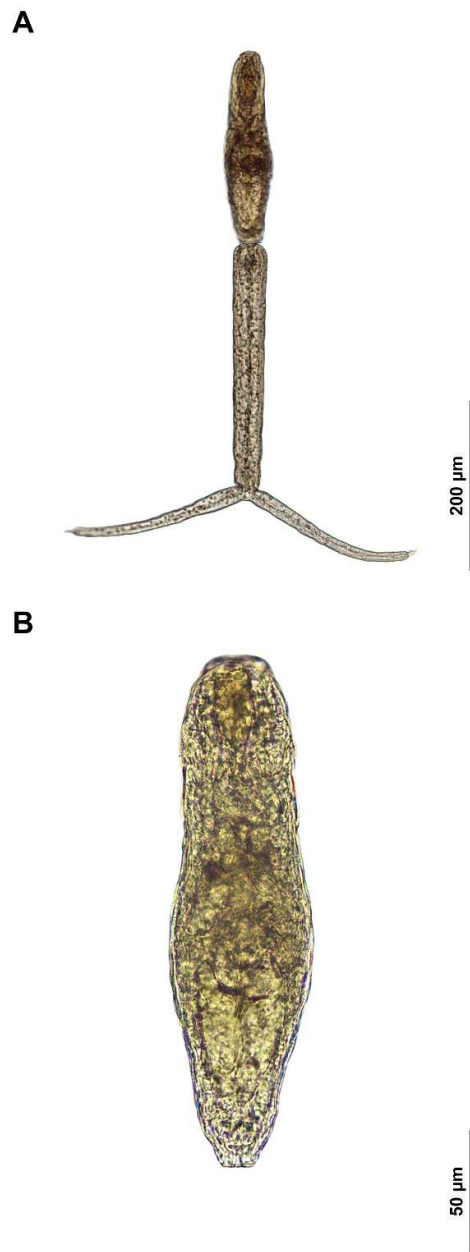


Figura 50 – Schistosomatidae gen. sp. 1 (A) Cercária (fixada em formol) detectada em *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano.



### 5.3.9.2.2 Schistosomatidae gen. sp. 2

Tipo cercariano: Brevifurcada.

Hospedeiro intermediário: *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,02% (1/4806).

Local de coleta: Ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 21/08/2019 (0,38%).

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=9): Larva com cauda bifurcada (Figura 51A). Corpo cercariano ovalado, 224 (204–240) × 84 (78–88), com tegumento espinhoso. Par de ocelos pigmentados, 8 (7–9) × 7 (7–9), localizados na região anterior do corpo. Presença de 5 pares de glândulas de penetração: 3 pré-acetabulares, 1 para-acetabular, 1 pós-acetabular (Figura 51B). Tronco caudal, 185 (173–197) × 43 (38–47), com tegumento espinhoso. Furcas curtas, 106 (90–119), com membranas natatórias (Figura 51C). São produzidas por esporocistos alongados (Figura 51D). As medidas foram incluídas na tabela 26.

#### *Caracterização molecular*

Foi obtida a sequência parcial de 28S do parasito (1010 bp), sendo incluída na análise filogenética juntamente com Schistosomatidae gen. sp. 1. Na árvore (Figura 52), evidenciou-se que apresenta uma relação próxima com um esquistossomatídeo de ave reportado no Quênia em *Biomphalaria sudanica* (BRANT et al., 2006), com um alto suporte. A divergência genética entre ambos parasitos foi de 4,5%.

*Comentários:* A cercária se caracterizou por apresentar furcas com membranas natatórias sem espinhos e menores ao tronco caudal, indicativos de se tratar de uma espécie da família Schistosomatidae (PINTO; MELO, 2013c). A presença de um par de ocelos permitiu estabelecer a afinidade com esquistossomatídeos de aves. A larva distingue-se de *Trichobilharzia* sp. (PINTO et al., 2014) e Schistosomatidae gen. sp. 1, por ter um valor maior da relação entre o tronco caudal e as furcas (>1,6). Enquanto a análise filogenética, foi possível detectar a proximidade com um esquistossomatídeo de ave encontrado no continente africano, porém, identificado apenas até nível de família.

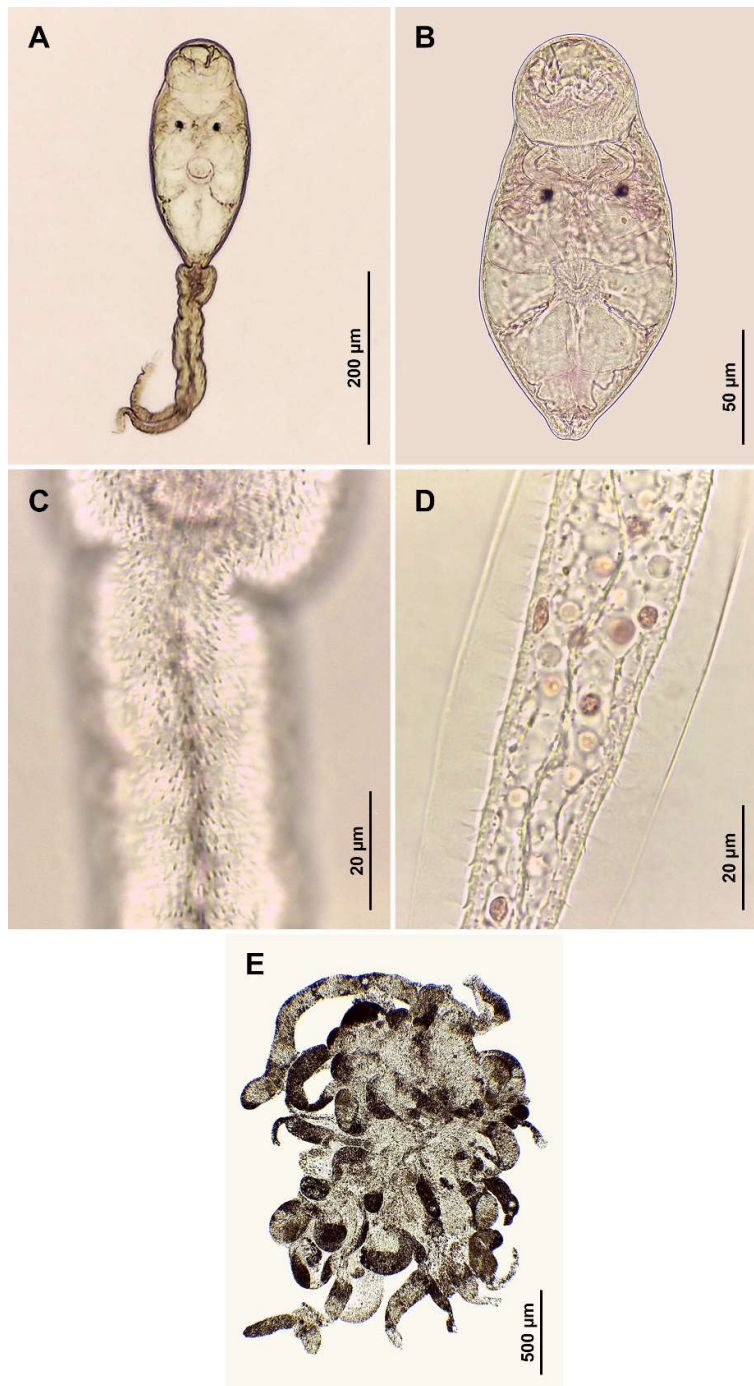


Figura 51 – Schistosomatidae gen. sp. 2. (A) Cercária emergida de *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corada pelo vermelho neutro. (B) Corpo cercariano. (C) Tronco caudal com microespinhos no tegumento. (D) Furca com membrana natatória. (E) Esporocistos recuperados de molusco infectado.

Tabela 26 – Comparação morfométrica das larvas de esquistossomatídeos encontrados no presente estudo com as reportados por outros autores no continente americano. C: Comprimento; L: Largura; d: diâmetro.

	Schistosomatidae gen. sp. 1		Schistosomatidae	Schistosomatidae	<i>Trichobilharzia</i> sp.
	Presente estudo	PINTO et al., 2017 Brasil	gen. sp. 2 Presente estudo	sp. 2 PINTO et al., 2017 EUA	PINTO et al., 2014 Brasil
Localidade Hospedeiro intermediário	<i>Biomphalaria straminea</i>	<i>B. glabrata</i>	<i>B. straminea</i>	<i>Gyraulus parvus</i>	<i>Physa marmorata</i>
Corpo	C 219 (206-240) L 59 (57-67)	218 (171-280) 57 (41-82)	224 (204-240) 84 (78-88)	288 (267-300) 79 (73-88)	216 (201-240) 82 (64-93)
Órgão anterior	C 72 (66-78) L 40 (36-43)	75 (55-96) 37 (14-48)	83 (76-88) 57 (52-64)	- -	66 (60-71) 51 (45-59)
Ventosa ventral	C 16 (16-17) L 18 (17-19)	14 (10-21) 20 (17-24)	20 (17-21) 21 (19-22)	- -	24 (19-29) 23 (17-27)
Tronco caudal (TC)	C 279 (256-303) L 45 (40-47)	291 (253-341) 34 (27-48)	185 (173-197) 43 (38-47)	362 (346-398) 51 (46-57)	336 (249-376) 44 (35-60)
Furcas (F)	C 205 (183-221) L 21 (19-22)	222 (205-239) -	106 (90-119) 11 (10-12)	221 (219-225) -	217 (177-236) 19 (11-27)
TC/F	1,4 (1,2-1,6)	1,31 (1,12-1,47)	1,8 (1,6-1,9)	1,57 (1,54-1,60)	1,56
Ocelos	C 5 L 5	5d -	8 (7-9) 7 (7-9)	- -	11 (9-13) 10 (8-14)

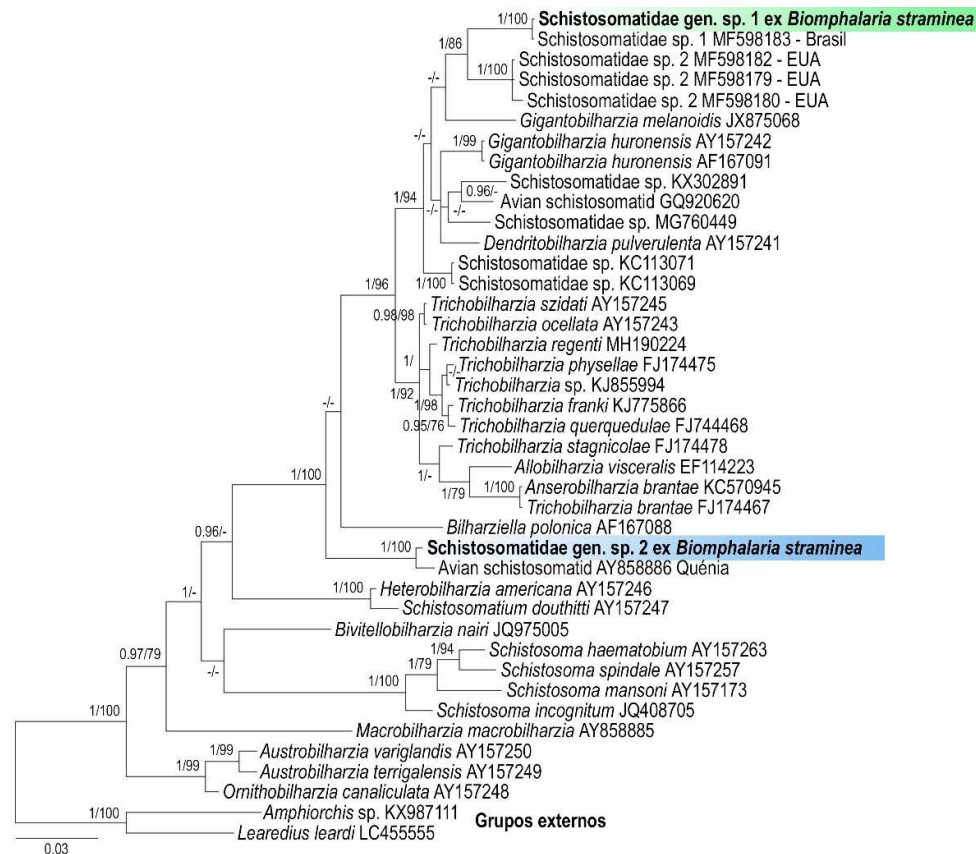


Figura 52 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança de representantes da família Schistosomatidae, inferida através de 28S (947 bp, modelo evolutivo GTR + G). Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.

### 5.3.9.3 Família Spirorchiidae Stunkard, 1921

#### 5.3.9.3.1 Spirorchiidae gen. sp.

Tipo cercariano: Brevifurcada.

Hospedeiro intermediário: *B. occidentalis*, *B. straminea*.

Percentual de infecção total: 0,35% (19/5478).

Local de coleta: Ponto C.

Coletas positivas e percentuais de infecção: 27/05/2018 (4,26%); 28/05/2018 (2%); 27/07/2018 (0,56%); 23/05/2019 (1,21%); 24/05/2019 (0,83%); 27/05/2019 (1,67%); 22/06/2019 (0,87%); 19/07/2019 (1,45%); 20/07/2019 (0,64%); 20/08/2019 (0,95%); 21/08/2019 (0,27%).

#### *Caracterização morfológica*

Cercária (n=15): Larva com cauda bifurcada (Figura 53A). Corpo, 270 (246–310) × 110 (106–120), com tegumento espinhoso (Figura 53C). Par de ocelos pigmentados, esféricos, 13 (12–16) × 13 (12–17), localizados na região anterior (Figura 53B). Presença de cinco pares de glândulas de penetração, posteriores aos ocelos. Órgão anterior ovalado, 97 (86–107) × 55 (52–61). Ventosa ventral rudimentar, 25 (22–26), pós-equatorial. Tronco caudal longo, 679 (634–704) × 63 (55–69), com tegumento coberto de microespinhos. Furcas curtas, 258 (249–271) × (45 (41–48), com membranas natatórias com espinhos (Figura 53D). Na tabela 27 são apresentadas comparações morfométricas com larvas semelhantes reportadas no Brasil.

#### *Caracterização molecular*

Foi obtido uma sequência parcial do gene 28S (1260 bp), que foi utilizado para a construção de um alinhamento com representantes da família Spirorchiidae, incluindo espécies de Schistosomatidae pela parafilia do grupo, sendo posteriormente analisada filogeneticamente. Na reconstrução filogenética (Figura 54), foi evidenciado que o parasito se encontra inserido em um clado formado por membros da família Spirorchiidae, transmitidos em ambientes dulciaquícolas e exclusivamente na América do Sul, com fortes valores de suporte. Ressalta-se que forma um clado com espiroquídeos relatados no estado de Minas Gerais (Spirorchiidae sp. 1 e Spirorchiidae sp. 2), detectados em *Biomphalaria* spp. (PINTO et al., 2015b). A divergência genética com esses dois

parasitos foi baixa (0-0,1%). Além disso, é distante de um espiroquídeo recentemente relado em *B. occidentalis* no estado de Paraná (2,4%) (CICCHETO et al., 2020). Já as diferenças moleculares com as outras espécies da família registradas na América do Sul foram maiores: *Paratamam iquitosiensis*, 2,4%; *Atamatam amazoniensis*, 2,5%; *Pitiutrema revelae*, 7,7% (BULLARD et al., 2019; DUTTON et al., 2019). A diferença molecular do presente parasito com membros do gênero tipo da família (*Spirorchis*) variou entre 19% e 20%.

*Comentários:* Por se tratar de uma larva com furcas menores ao tronco caudal e que possuem membranas natatórias com espinhos, foi identificado preliminarmente como da família Spirorchiidae (PINTO; MELO, 2013c). A análise molecular corroborou a identificação. A cercária apresenta medidas semelhantes à *Spirorchiidae* sp. 1 encontradas em Belo Horizonte (PINTO et al., 2015b). Já a cercária *Spirorchiidae* sp. 2 reportado por Pinto et al. (2015b) apresenta maiores dimensões e detectando uma diferença molecular de 0,1% com a do presente estudo. Em se tratando da comparação com o espiroquídeo relatado no Paraná (CICCHETO et al., 2020), morfometricamente não foram detectadas diferenças marcantes, talvez por terem analisado larvas intramolusco e fixados em etanol. Porém, foi corroborada a diferença pela análise molecular. Frente a isso, o parasito deste estudo é identificado como um membro da problemática família Spirorchiidae, que apresenta mais afinidades com espécies reportadas na América do Sul em coleções dulciaquícolas.

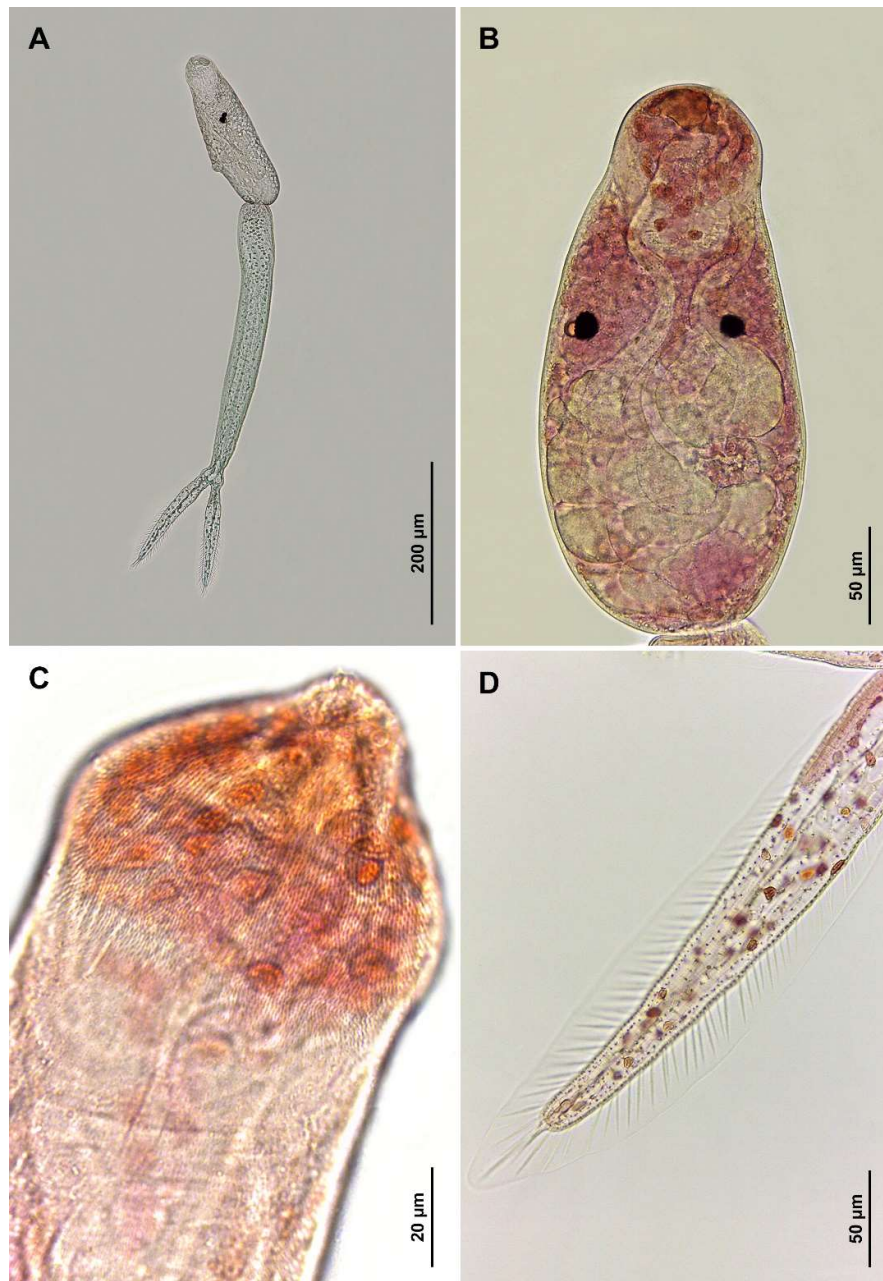


Figura 53 – Spirorchiidae gen. sp. (A) Cercária detectada em *Biomphalaria straminea* coletada no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. (B) Corpo cercariano com vermelho neutro. (C) Detalhe do tegumento com microespinhos na região anterior do corpo. (D) Furca com membrana natatória com espinhos.

Tabela 27 – Comparação morfométrica das larvas da família Spirorchiidae encontradas no presente estudo com dados disponíveis para outras espécies registradas no continente americano. C: Comprimento; L: Largura.

		Spirorchiidae sp. Presente estudo <i>Biomphalaria</i> spp.	Spirorchiidae sp. 1 PINTO et al., 2015b <i>Biomphalaria</i> spp.	Spirorchiidae sp. 2 PINTO et al., 2015b <i>B. glabrata</i>	Spirorchiidae sp. “ingá” CICCHETO et al., 2021 <i>B. occidentalis</i>
Nº de glândulas de penetração		5	6	6	-
Corpo	C	270 (246-310)	230 (205-259)	326 (273-375)	260 (158-326)
	L	110 (106-120)	91 (81-109)	97 (75-143)	79 (42-112)
Órgão anterior	C	97 (86-107)	81 (68-86)	106 (94-120)	87 (56-112)
	L	55 (52-61)	53 (43-58)	52 (46-62)	48 (27-64)
Ocelos	C	13 (12-16)	-	-	-
	L	13 (12-17)	-	-	-
Ventosa ventral	C	25 (22-26)	27 (24-29)	25 (21-29)	34 (24-46)
	L	22 (21-24)	28 (26-34)	26 (22-33)	19 (14-27)
Tronco caudal	C	679 (634-704)	695 (655-717)	784 (683-853)	554 (414-661)
	L	63 (55-69)	64 (46-72)	63 (53-79)	52 (27-74)
Furcas	C	258 (249-271)	255 (225-287)	316 (280-341)	177 (107-234)
	L	45 (41-48)	45 (36-53)	43 (29-51)	29 (18-41)



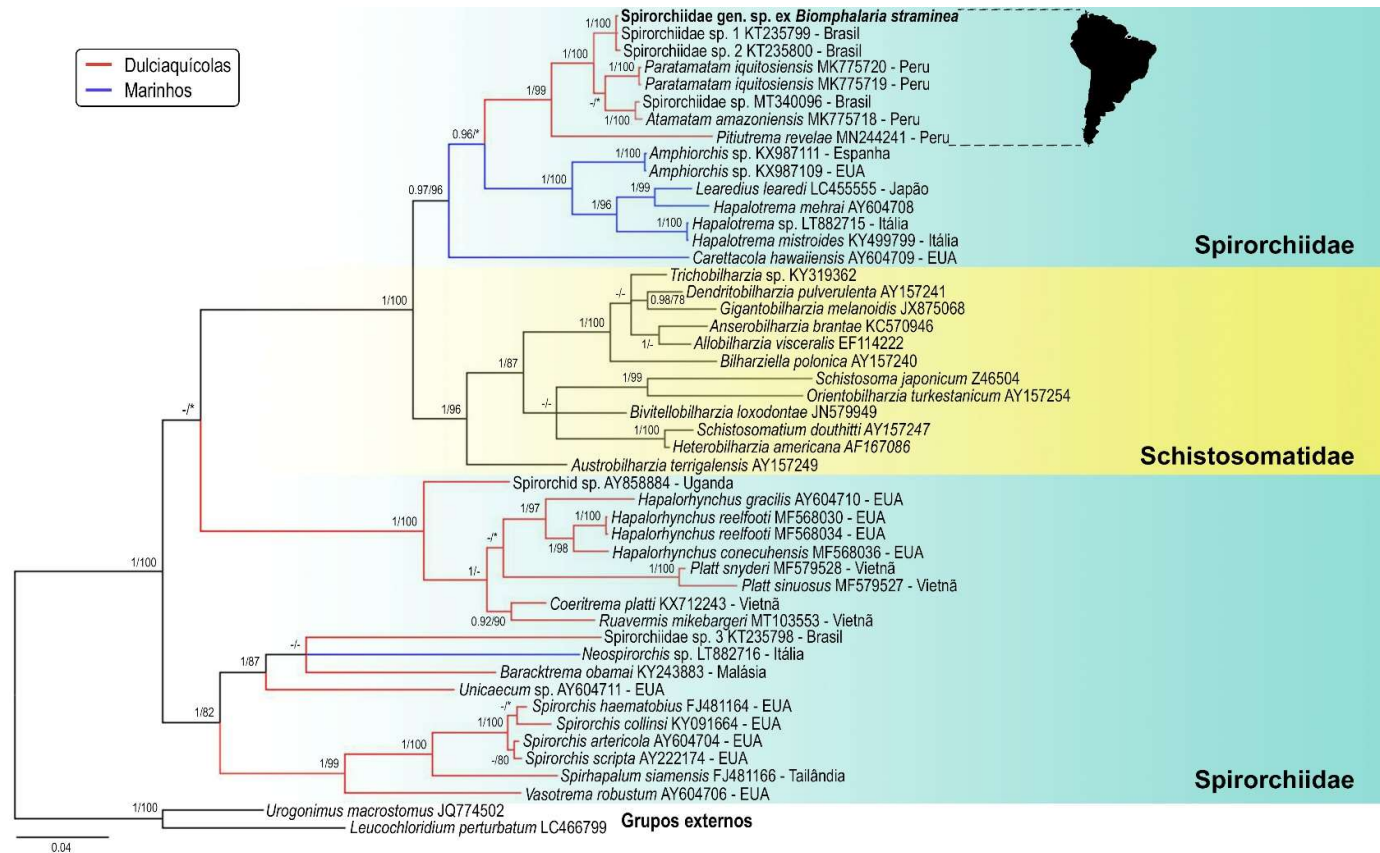


Figura 54 – Árvore filogenética obtida pelos métodos de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança de representantes da família Spirorchiidae, inferida através de 28S (939 bp, modelo evolutivo: GTR + G + I). Os valores de probabilidade posterior (>0,90) e *bootstrap* (>70%) são representados na parte superior de cada nó. (\*) Asteriscos nos nós sinalizam diferenças na topologia recuperada por MV. A barra indica o número de substituições por nucleotídeo.

#### 5.4 Trematódeos recuperados em peixes, sem moluscos transmissores identificados

Além das espécies encontradas em moluscos, 4 espécies de trematódeos foram encontradas apenas em peixes. Assim, os primeiros hospedeiros intermediários não foram detectados durante as coletas malacológicas realizadas. Em exemplares de Poecilidae gen. sp. foram recuperadas as metacercárias de *Apharyngostrigea* sp. (2,56%; 1/39) (Figura 55A) e *Posthodiplostomum nanum* (20,5%; 8/39) (Figura 55C). Foi possível obter apenas o fragmento de ITS1-5.8S-ITS2 do último parasito, apresentando 99,5% de similaridade com uma sequência de *P. nanum* procedente do Brasil (LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2018). Outro diplostomídeo encontrado no presente estudo foi Crassiphialinae gen. sp. (8,3%; 1/12) (Figura 55E), recuperado do globo ocular de *Australoheros* sp. A região *barcode* do *cox1* foi amplificada parcialmente, contudo, não foi evidenciada a completa identidade quando comparada com sequências dessa subfamília.

*Neocladocystis intestinalis* (Figura 55B) foi detectado em *Salminus franciscanus*. As características morfológicas estão de acordo com a descrição feita por Manter (1969) para o parasito. Sequência parcial de 28S foi obtido para *N. intestinalis*, verificando que a divergência genética com *Neocladocystis* spp. reportados no continente africano variou entre 8% e 7,9%. Estudos futuros com *N. intestinalis* poderão revelar coespecificidade com as cercárias do mesmo gênero encontradas em *Aylacostoma tuberculatum*.



Figura 55 – Outros trematódeos recuperados de peixes no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais, corados pelo carmim. (A) *Apharyngostrigea* sp. (B) *Neocladcystis intestinalis*. (C) *Posthodiplostomum nanum*. (D) Crassiphialinae gen. sp.

## 6 DISCUSSÃO

Uma característica inerente aos representantes da classe Trematoda é a complexidade verificada nos padrões de seus ciclos de vidas (CRIBB, 2016). Isso permite o uso dos diferentes estágios de desenvolvimento destes parasitos em vários tipos de estudos, incluindo análise estimativa da biodiversidade nos ciclos parasitários, história evolutiva bem como em estudos ecológicos, incluindo o uso destes organismos como indicadores da saúde de ecossistemas (HUDSON et al., 2006; MORLEY, 2012). Além disso, a riqueza e abundância de espécies de parasitos em grupos de hospedeiros mais acessíveis, como moluscos, podem fornecer uma estimativa da riqueza de outros hospedeiros envolvidos nos diferentes ciclos biológicos dos parasitos de uma dada localidade (BYERS et al., 2010).

A cercária é a forma larval que vem sendo considerada nesses tipos de abordagens em estudos malacológicos, principalmente por possuir uma variedade de estruturas para identificação em comparação com os estágios intramolusco (PINTO; MELO, 2013b; FALTÝNKOVÁ et al., 2016). Adicionalmente, a incorporação de ferramentas moleculares no estudo de trematódeos verificados desde o início da década de 1990, tem auxiliado em uma melhor discriminação da diversidade de cercárias, possibilitando em alguns casos, associar com os respectivos adultos de espécies ocorrentes em um determinado ambiente (BLASCO-COSTA et al., 2016; GORDY; HANINGTON, 2019; DUAN et al., 2021). Contudo, este tipo de pesquisa integrando a descrição morfológica e molecular de cercárias vêm sendo realizadas principalmente na África, Ásia, Europa e América do Norte (BRANT et al., 2006; GORDY et al., 2016; CHONTANANARTH et al., 2017; SOLDÁNOVÁ et al., 2017; OUTA et al., 2020; SCHWELM et al.; 2021), sendo os estudos na América do Sul relativamente escassos.

No Brasil, aproximadamente 50 espécies de trematódeos foram identificadas em 25 espécies de moluscos de água doce (PINTO; MELO, 2013c), o que revela uma grande lacuna no conhecimento diante da numerosa fauna destes parasitos reportadas em vertebrados no país (mais de 800 espécies) (COHEN et al., 2021). Contudo, na última década alguns grupos de pesquisa vêm aplicando a taxonomia integrativa para a identificação de larvas de trematódeos encontradas em moluscos dulciaquícolas no país. Estes estudos têm resultado em informações relevantes como o registro de novos hospedeiros na elucidação de ciclos biológicos, assim como na criação de uma base de dados moleculares para cercárias ainda não identificadas em nível específico, mas que

futuramente poderá se conectar com dados a serem obtidos para os respectivos estágios adultos (PINTO et al., 2015ab, 2017; ASSIS et al., 2019; LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019; LOPES et al., 2020, 2021; ONACA et al., 2020). É relevante enfatizar que os estudos prévios realizados com formas larvais encontradas em moluscos no Brasil foram realizados principalmente em ambientes lênticos, sendo escassos estudos desta natureza em rios.

No presente estudo foi verificado o envolvimento de moluscos na transmissão de 31 espécies de trematódeos no RSF, em sua porção que passa pela cidade Januária, norte de Minas Gerais. Apesar da importância deste rio para o país, e de sua rica fauna de vertebrados e invertebrados, este corresponde ao primeiro trabalho com enfoque em larvas de trematódeos encontradas em moluscos realizado no RSF. A ampla riqueza de trematódeos verificada na área de estudo aponta para a presença de populações dos diferentes tipos de hospedeiros envolvidos entre eles e ainda para a ocorrência dos processos envolvidos na transmissão dos diferentes estágios evolutivos. Por outro lado, estudos apontam que a ocorrência de alterações antrópicas como lançamento de resíduos da indústria, mineração, agropecuária e atividades desenvolvidas no meio urbano tem levado a alterações ambientais no RSF (ZELLHUBER; SIQUEIRA, 2016; CASTRO; PEREIRA, 2019), o que poderia impactar os ciclos biológicos de trematódeos. Apesar disso, a diversidade de trematódeos encontradas na área do presente estudo parece indicar uma condição ambiental favorável, o que demanda estudos adicionais, inclusive com a proposta de utilização destes organismos como bioindicadores, abordagem discutida por alguns autores (HUDSON et al., 2006; MORLEY, 2012).

A emergência de cercária do tipo Lofocercária, característica dos representantes da família Clinostomidae foi detectada em *B. straminea* no presente trabalho. A análise molecular com o uso de sequências do gene *cox1*, e a obtenção de metacercária em peixe naturalmente infectado, permitiu a identificação do parasito como *Clinostomum heluans*. Esta espécie, descrita no continente americano, é encontrada na sua fase adulta na boca e esôfago de aves da família Ardeidae, já tendo sido reportada no Brasil, Cuba, México e Venezuela (TRAVASSOS et al., 1969; FERNANDES et al., 2015; BRIOSIO-AGUILAR et al., 2018). É importante destacar que este corresponde ao primeiro registro confirmado do encontro de moluscos infectados por *C. heluans*, tendo em vista que as metacercárias obtidas experimentalmente por Lutz (1934) e associadas a esta espécie, possuem morfologia distinta (PINTO et al., 2015a).

No RSF, foi relatada a ocorrência de uma espécie de *Clinostomum* em *Pimelodus maculatus* (BRASIL-SATO; PAVANELLI, 2004), contudo não há dados morfológicos e morfométricos para comparação. Contudo, o sitio de infecção do parasito é diferente do verificado para *C. heluans* (brânquias vs. nadadeiras), o que pode indicar tratar-se de espécies distintas. Os exemplares recuperados de *Australoheros* sp. no presente trabalho possuem morfologia geral compatível com a descrita para metacercárias de *C. heluans* encontradas em *Cichla temensis* no estado do Amazonas por Vicente et al. (1978), apesar de serem levemente maiores. *Clinostomum heluans* pode ser facilmente diferenciado de outras espécies que ocorrem no continente americano pela localização das estruturas reprodutivas na porção final do corpo. Além disso, são muito menores que a metacercária de *C. detruncatum*, uma das outras espécies registradas no território brasileiro (ACOSTA et al., 2016). A metacercária *Clinostomum* sp. relatada no estado de Minas Gerais (PINTO et al., 2015a), cuja cercária foi também encontrada em *B. straminea*, se distingue pelo maior corpo e ventosa ventral proeminente, além de possuir o testículo posterior maior que o anterior. Neste último caso, a diferença morfológica foi corroborada molecularmente.

Cinco morfotipos do tipo cercariano Estrigeocercária, característico dos representantes da superfamília Diplostomoidea, foram encontrados em *B. straminea* no RSF. Três correspondem à família Diplostomidae (*A. compactum*, *Hysteromorpha* sp. e *Tylodelphys* sp.) e duas à família Strigeidae (*Cotylurus* sp. e *Parastrigea* sp.).

*Austrodiplostomum compactum* é parasito intestinal da ave neotropical biguá, *Nannopterum brasilianus*, que apresenta uma ampla distribuição no continente americano, tendo sido relatado em vários países do continente, desde os EUA até o Brasil (FERNANDES et al., 2015; SERENO-URIBE et al., 2019). O ciclo biológico é complexo, envolvendo a participação de moluscos do gênero *Biomphalaria* como primeiro hospedeiro intermediário, e peixes, como segundo hospedeiro intermediário (PINTO; MELO, 2013). Esta espécie se diferencia de *A. mordax*, reportada exclusivamente no território argentino, pela localização da metacercária nos peixes que atuam como segundos hospedeiros intermediários (globo ocular vs. cérebro) (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2017). Ressalta-se que o parasitismo ocular pode ter efeito negativo no hospedeiro, e em alta intensidade pode desencadear exoftalmia, deslocamento da retina, opacidade do cristalino, cegueira e até a morte (CORRÊA et al., 2013; CAMPOS et al., 2020).

No Brasil, *B. glabrata* e *B. straminea* foram registrados como primeiros hospedeiros intermediários de *A. compactum* por Pinto & Melo (2013a) na lagoa da Pampulha, em Belo Horizonte. No presente estudo foi identificado molecularmente que *B. straminea* é o molusco transmissor do parasito no RSF, sendo observada uma prevalência de infecção baixa (0,08%; 4/4.821). A taxa de infecção verificada por Pinto e Melo (2013a) (1,11%; 68/14.948) foi relativamente maior, o que pode estar relacionado a diferenças no tipo ambientes (rural vs. urbano) e principalmente ao estado de eutrofização verificado na lagoa da Pampulha.

Diversos autores já relataram o encontro de metacercária de *A. compactum* em peixes do RSF. Este parasito é bastante inespecífico para o peixe hospedeiro intermediário, sendo 14 espécies pertencentes às famílias Anostomidae, Auchenipteridae, Characidae, Cichlidae, Curimatidae, Pimelodidae, Pseudopimelodidae e Sciaenidae, já registradas albergando o parasito neste rio (SABAS; BRASIL-SATO, 2014; SANTOS-CLAPP; BRASIL-SATO, 2014; MONTEIRO et al., 2016). No presente estudo metacercárias de *A. compactum* foram detectadas em *Australoheros* sp. (Cichlidae) e um representante da família Poeciliidae, tratando-se de novos hospedeiros intermediários para o RSF.

Trematódeos do gênero *Hysteromorpha* são parasitos intestinais de aves das famílias Ardeidae, Burhinidae e Phalacrocoracidae (NIEWIADOMSKA, 2002a). Planorbídeos (espécies de *Gyraulus* e *Biomphalaria*) são reconhecidos como os moluscos transmissores (HUGGHINS, 1954; LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019). Além destes hospedeiros, há a participação de peixes, nos quais ocorre a formação de metacercária na superfície corporal e musculatura. É importante mencionar que estes parasitos é um dos agentes etiológicos da Doença dos Pontos Pretos (*Black Spot disease*) nestes segundos hospedeiros intermediários. O gênero está atualmente constituído por duas espécies: *H. triloba*, restrito ao continente europeu, e *H. corti* presente em América Central e do Norte (LOCKE et al., 2018). A ocorrência de uma terceira espécie foi sugerido por López-Hernández et al. (2019) através da análise de sequências moleculares de formas larvais de *Hysteromorpha* sp. procedentes do Brasil, mas ainda sem descrição morfológica do adulto.

No presente estudo, a obtenção da sequência de ITS1-5.8S-ITS2, confirmou a identificação deste parasito como uma espécie do gênero *Hysteromorpha*. Contudo, este marcador não possibilita avançar na identificação específica deste parasito. Para isso, tentativas na amplificação da região *barcode* do gene *cox1* foram realizadas, mas sem

sucesso. Já na comparação dos dados morfométricos, não foi detectada uma distinção em relação às cercárias de *H. corti* (EUA; HUGGHINS, 1954) e *Hysteromorpha* sp. (LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019). É possível que o isolado encontrado no RSF corresponda à mesma espécie isolado previamente identificado em *B. straminea* no Brasil. Até o presente, a outra espécie que ocorre no continente, *H. corti*, apresenta distribuição geográfica exclusiva para a América do Norte. Além disso, a espécie tipo do gênero, *H. triloba*, previamente registrada na América do Sul por diferentes autores (DRAGO et al., 2011), é atualmente considerada de ocorrência restrita à Europa (DUBOIS, 1970; MONTEIRO et al., 2011; LOCKE et al., 2018). De qualquer forma, este encontro corresponde ao primeiro relato de primeiro hospedeiro intermediário de *Hysteromorpha* sp. no RSF, sendo estudos necessários para se identificar os segundos hospedeiros intermediários e hospedeiro definitivo que participam do ciclo biológico do parasito na região.

O gênero *Tylodelphys* é considerado de distribuição cosmopolita e inclui espécies de diplostomídeos que parasitam aves das famílias Accipitridae, Ardeidae, Ciconiidae e Podicipedidae. A metacercária é do tipo “Diplostomulum”, sendo encontrada em peixes ou anfíbios (NIEWIADOMSKA, 2002a). Nestes segundos hospedeiros intermediários, o parasito pode ser encontrado livre nos olhos ou nas cavidades craniana e visceral (GARCÍA-VARELA et al., 2016). Atualmente 17 espécies são conhecidas, das quais 9 são encontradas no continente americano: *T. adulta* Lunaschi & Drago, 2004; *T. americana* (Dubois, 1936); *T. azteca*; *T. brevis* Drago & Lunaschi, 2008; *T. conifera* (Mehlis, 1929); *T. elongata* (Lutz, 1928); *T. immer* Dubois, 1961; *T. robraschi* Dubois, 1969 e *T. scheuringi* (Hughes, 1929) (LUNASCHI; DRAGO, 2004; DRAGO; LUNASCHI, 2008; FERNANDES et al., 2015; GARCÍA-VARELA et al., 2016; ACHATZ et al.; 2022).

No Brasil, duas espécies de *Tylodelphys* apenas foram relatadas, principalmente em ciconídeos migratórios: *T. americana* e *T. elongata* (FERNANDES et al., 2015). Os registros de metacercárias em peixes são também pouco numerosos, e em sua totalidade não chegaram a uma identificação taxonômica até o nível de espécie (CORRÊA; BRASIL-SATO, 2008; LACERDA et al., 2008, VITAL et al.; 2018; PELEGRINI et al., 2019). No presente estudo, metacercárias de *Tylodelphys* sp. foram obtidas através de infecção experimental de *P. reticulata* expostas a cercárias emergidas de *B. straminea*. As metacercárias, encontradas livres na cavidade visceral, apresentaram morfologia geral compatível com o gênero. O uso do marcador ribossomal 28S possibilitou delimitar ao



presente parasito como um membro do gênero *Tylodelphys*, apresentando relação próxima com *Tylodelphys* cf. *americana* (ACHATZ et al., 2022). No RSF já foi reportada a metacercária de *Tylodelphys* sp. no intestino e bexiga natatória *Pseudoplatystoma corruscans* na cidade de Três Marias (CORRÊA; BRASIL-SATO, 2008). No entanto, estes autores não apresentaram dados morfométricos que possibilitem a comparação. Em um outro estudo, Pelegrini et al. (2019) relataram a presença da metacercária de *Tylodelphys* sp. na cavidade visceral de *Hoplias malabaricus* no estado de São Paulo. Contudo, há importantes diferenças morfométricas que parecem indicar que se tratam de espécies distintas. Estudos moleculares futuros, com a obtenção de sequências região *barcode* do *cox1*, poderá trazer informações definitivas sobre a coespecificidade ou não destes isolados. Quanto aos potenciais hospedeiros definitivos, é importante comentar que as aves migratórias *Mycteria americana* e *Jabiru mycteria* já foram registradas no RSF, hospedeiros definitivos naturais de *T. americana* e *T. elongata*, respectivamente (ALVES et al., 2011; FERNANDES et al., 2015). Recentemente, Achatz et al. (2022) obtiveram dados moleculares para uma amostra de *T. americana* oriunda do Brasil. Porém, análises futuras são necessárias para se avaliar a possibilidade dos estágios larvais obtidos em Januária corresponderem a esta espécie.

Os estudos envolvendo a identificação dos primeiros hospedeiros intermediários envolvidos na transmissão de *Tylodelphys* spp. no continente americano são escassos. Na Argentina foi reportada a transmissão de *Tylodelphys* sp. por *Chilina* sp., um molusco que pertence a uma família diferente (Chilinidae vs. Planorbidae) (OSTROWSKI DE NÚÑEZ; QUAGGIOTTO, 1995). Já nos EUA, foi detectada a infecção do planorbídeo *Biomphalaria havanensis* por *Tylodelphys* sp. (ROSSER et al., 2016). Contudo, este isolado se apresentou distante filogeneticamente como observado na análise. O presente achado corresponde ao primeiro registro do envolvimento de *B. straminea* na transmissão de um representante do gênero *Tylodelphys* no Brasil.

Membros do gênero *Cotylurus* são parasitos intestinais de aves das famílias Anatidae, Charadriidae e Scolopacidae, presente em regiões holárticas, neotropicais e orientais (NIEWIADOMSKA, 2002b). Os moluscos que participam no ciclo biológico de *Cotylurus* spp. são de ambiente dulciaquícolas e pertencem aos gêneros *Stagnicola*, *Lymnaea*, *Physa* e *Helisoma* (CHAI, 2019). A metacercária destes parasitos é do tipo “Tetracotyle” e o segundo hospedeiro intermediário pode ser o mesmo molusco transmissor ou anelídeos (sanguessugas) (NIEWIADOMSKA, 2002b).

Na América do Sul, três espécies do gênero têm sido relatadas: *C. cornutus*, *C. gallinulae* e *C. lutzi*, destacando-se que todas possuem registros no Brasil (FERNANDES et al., 2015). Destas, o molusco primeiro hospedeiro intermediário é conhecido apenas para *C. lutzi*, que teve seu ciclo biológico elucidado a partir de cercárias encontradas em *B. glabrata* (BASCH, 1969). No presente estudo foi detectada a infecção de *B. straminea* por *Cotylurus* sp. As características morfológicas da cercária e o encontro da metacercária do tipo “Tetracotyle” no molusco transmissor foram indicativos iniciais de tratar-se de uma espécie desse gênero. Com auxílio de um fragmento da região *barcode* do gene *cox1* foi confirmada a identificação do parasito, o qual se revelou coespecífico com o isolado de *Cotylurus* sp. previamente detectado também em *B. straminea* na cidade de Belo Horizonte (LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019). Estes estágios larvais provavelmente correspondem a *C. lutzi*, espécie descrita da mesma área geográfica (BASCH, 1969) mas para a qual ainda não existem dados moleculares. A similaridade observada entre dados morfométricos destes estágios larvais é um indicativo disso. Contudo, a obtenção de adultos de *C. lutzi* a partir da realização de estudos experimentais ou do encontro do hospedeiro definitivo naturalmente infectado se faz necessário para se confirmar esta hipótese.

O gênero *Parastrigea* é representado por parasitos intestinais de diversos grupos de aves (NIEWIADOMSKA, 2002b; DRAGO; LUNASCHI, 2011). No ciclo biológico destes parasitos, anuros participam como segundos hospedeiros intermediários, nos quais se desenvolvem metacercárias do tipo “Tetracotyle”. Atualmente 19 espécies de *Parastrigea* são conhecidas, das quais 7 ocorrem em áreas neotropicais: *P. buffoni* Drago, Núñez & Lunaschi, 2018, *P. caballeroi* Dubois, 1952, *P. cincta*, *P. diovadena*, *P. macrobursa* Drago & Lunaschi, 2011, *P. mexicana* Coil, 1957 e *P. plataleae* (DRAGO; LUNASCHI, 2011; HERNÁNDEZ-MENA et al., 2014; DRAGO et al., 2018). Recentemente, análises morfológicas e moleculares resultaram na transferência de *P. brasiliana* e *P. robusta* para os gêneros *Apharyngostrigea* Ciurea, 1927 (LÓPEZ-JIMÉNEZ et al., 2022) e *Strigea* Abildgaard, 1970 (HENEBERG et al., 2018), respectivamente.

Para o território brasileiro existe apenas o relato de *P. cincta*, encontrado em *Ardea* sp. (Ardeidae) e *Micrastur gilvicollis* (Falconidae) (FERNANDES et al., 2015). Estudos envolvendo os estágios larvais destes parasitos eram inexistentes até então, sendo este o primeiro registro da participação de *B. straminea* no ciclo biológico de *Parastrigea* sp. Além disso, a infecção natural de *Rhinella* sp. por metacercárias de *Parastrigea* sp. é

também registrada pela primeira vez no Brasil. Na Argentina foi identificada uma estrigeocercária possuindo 8 pares de glândulas de penetração emergida em *B. straminea* (FERNÁNDEZ; HAMANN, 2017), o mesmo número verificado no presente estudo. Apesar disso, as larvas encontradas em Januária são menores. Ressalta-se que na diagnose do gênero, é citado que a cercária de *Parastrigea* spp. se caracteriza por apresentar 7 pares de glândulas de penetração (NIEWIADOMSKA, 2002b). É possível que essa diagnose tenha sido realizada a partir da cercária de *Strigea robusta* (Szidat, 1928) Heneberg & Sitko, 2018, identificada como *Parastrigea robusta* por Odening (1965). Assim, estudos futuros são necessários para se determinar e atualizar as informações sobre as características relacionadas à diagnose destes gêneros.

No presente estudo, a análise de moluscos oriundos do RSF revelou a participação destes invertebrados na transmissão de 8 espécies de trematódeos representantes da superfamília Echinostomatoidea e alocados, nas famílias Echinochasmidae, Echinostomatidae e Philophthalmidae.

Os membros da família Echinochasmidae, recentemente elevado a essa categoria taxonômica, são parasitos intestinais cosmopolitas de aves, mamíferos e répteis (TKACH et al., 2016). Os primeiros hospedeiros intermediários são em sua maioria moluscos de água doce pertencentes ao grupo dos Caenogastropoda, com alguns ciclos identificados em espécies de basomatóforos. Já os segundos hospedeiros intermediários podem ser peixes, anfíbios ou molusco. A família Echinochasmidae inclui atualmente 7 gêneros: *Dissurus* Verma, 1936; *Echinochasmus*; *Mehrastomum* Saksena, 1959; *Microparyphium*; *Pulchrosomoides* Freitas & Lent, 1937; *Saakotrema* Skrjabin & Bashkirova, 1956 e *Stephanoprora*. No Brasil foram reportadas espécies dos gêneros *Echinochasmus*, *Microparyphium*, *Pulchrosomoides* e *Stephanoprora*. Entre eles, o número de espécies do gênero *Stephanoprora* é maior, sendo *S. nattereri* Ostrowski de Núñez, 2003 reportado em *Caiman crocodilus*, e *S. anomala* Travassos, 1922, *S. conciliata* (Dietz, 1909), *S. denticulata* (Rudolphi, 1802), *S. pseudoechinata* Olsson, 1876 e *S. uruguayense* Holeman-Spector & Olagüe, 1989, em aves (FERNANDES; KOHN, 2014; FERNANDES et al., 2015). Apesar desta diversidade, estudos relacionados a identificação dos hospedeiros intermediários são escassos e possivelmente limitado ao encontro de uma cercária do grupo Magnacauda, *Echinocercaria stylites*, reportada de *Aylacostoma* sp procedentes do Rio das Velhas, estado de Minas Gerais (LUTZ, 1924). No presente trabalho foram dois morfotipos de cercárias identificadas como pertencentes ao gênero *Stephanoprora* foram detectados em *A. tuberculatum* coletados no RSF em

Januária. Apesar das sequências obtidas para o marcador *nad1* terem confirmado a ocorrência de duas espécies deste gênero na localidade (*Stephanoprora* sp. 1 e *Stephanoprora* sp. 2), a identificação específica dos parasitos não foi possível devido à ausência de dados moleculares para as espécies descritas em América do Sul.

As medidas das larvas aqui identificadas como *Stephanoprora* sp. 1 são próximas as obtidas para *S. aylacostoma*, espécie descrita a partir de estudos experimentais realizados com cercárias encontradas em *A. chloroticum* do Rio Paraná, na Argentina (OSTROWSKI DE NÚÑEZ; QUINTANA, 2008). No entanto, apesar da similaridade morfológica entre estas larvas, a impossibilidade de obtenção de parasitos adultos no presente estudo, associada com a inexistência de sequências moleculares para *S. aylacostoma*, não permitiram reforçar a coespecificidade. Por outro lado, a possibilidade de se tratar de uma espécie do gênero para a qual o primeiro hospedeiro intermediário é ainda desconhecido não pode ser descartada, tendo em conta o número de espécies do gênero registradas no país. A obtenção de dados moleculares a partir do estágio adulto de *S. aylacostoma* poderão auxiliar na identificação específica deste parasito. Além disso, a realização do ciclo biológico de forma experimental também deve ser considerada, já utilizada com sucesso para *S. uruguayense* (OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2007) e *S. aylacostoma* (OSTROWSKI DE NÚÑEZ; QUINTANA, 2008). No presente estudo, exemplares de *P. reticulata* foram utilizados experimentalmente como segundo hospedeiro intermediário para *Stephanoprora* sp. 1, porém, sem sucesso. Nesse sentido, o uso de outras espécies de peixes como modelos biológicos poderá resultar na obtenção de metacercárias para a infecção de potenciais hospedeiros definitivos. A outra espécie do gênero estudada, *Stephanoprora* sp. 2, foi detectada apenas na última visita à área de estudo (08/2019) em comparação de *Stephanoprora* sp. 1, encontrada frequentemente desde o início das coletas. No caso das cercárias de *Stephanoprora* sp. 2, estas apresentaram levemente maiores medidas que as de *S. uruguayense*. Diante disso, torna-se necessário o sequenciamento de um marcador mitocondrial como o *nad1*, para corroborar dita distinção. Além disso, o baixo número de larvas eliminadas pelos moluscos infectados impossibilitou a realização de estudos experimentais.

Um terceiro membro da família Echinochasmidae foi também verificado em *A. tuberculatum*. A análise filogenética revelou tratar-se de um gênero diferente de *Echinochasmus* e *Microparyphium*. Cabe a possibilidade de se tratar de uma espécie de *Pulchrosomoides*, reportado em répteis no país (FERNANDES; KOHN, 2015), mas ainda sem sequências moleculares disponíveis para comparação, ou talvez, de um gênero não

descrito. Entre as larvas de trematódeos conhecidas de moluscos na América do Sul, não há nenhuma com características morfológicas similares às aqui descritas para Echinochasmidae gen. sp.

A família Echinostomatidae é uma das mais diversificadas, com ampla distribuição e está conformada por espécies parasitas de aves, mamíferos e répteis (KOSTADINOVA, 2005a). O primeiro hospedeiro intermediário da maioria das espécies é um molusco pulmonado, embora exista relato de espécies que utilizam um caenogastropoda como molusco transmissor. Já o segundo hospedeiro intermediário pode ser uma espécie de moluscos, peixes ou anfíbios (TKACH et al., 2016). No presente trabalho foram detectadas 4 espécies desta família: *Drepanocephalus* sp., *Echinostoma* sp., *Ribeiroia* sp. e Echinostomatidae gen. sp.

Membros do gênero *Drepanocephalus* são parasitos intestinais de aves piscívoras pertencentes aos gêneros *Nannopterum* e *Sula*, no continente americano (KOSTADINOVA, 2005a). Atualmente o gênero está constituído por 4 espécies: *D. auritus* Kudlai, Kostadinova, Pulis & Tkach, 2015, *D. mexicanus*, *D. olivaceus* Nasir & Marval, 1968 e *D. spathans* (HERNÁNDEZ-CRUZ et al., 2018). Destas, apenas *D. auritus* ainda não foi registrada no Brasil (FERNANDES et al., 2015). Com relação aos moluscos transmissores, larvas de *D. mexicanus* e *D. spathans* foram identificadas em *B. straminea* em estudos morfológicos e moleculares realizados a partir de amostras coletadas na Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte (PINTO et al., 2016). No presente trabalho foi detectada a emergência da cercária de *Drepanocephalus* sp. de *B. straminea*, a qual apresentou medidas menores quando comparada com as cercárias de *D. mexicanus* e *D. spathans*. Estudos futuros são necessários para a obtenção de sequências moleculares deste parasito, o que permitirá verificar que as diferenças encontradas se tratam de uma variação morfométrica de uma das espécies mencionadas anteriormente. Contudo, é necessário também se considerar a possibilidade desta larva corresponder a *D. olivaceus*, outra espécie do gênero já reportada no Brasil, mas que ainda não possui estágios larvais e moluscos transmissores conhecidos.

Os trematódeos pertencentes ao gênero *Echinostoma* são parasitos intestinais de aves e mamíferos com distribuição cosmopolita. Os primeiros hospedeiros intermediários são principalmente moluscos pulmonados, existindo ainda algumas espécies registradas em prosobrânquios. Já os segundos hospedeiros intermediários de *Echinostoma* spp. são também moluscos, além de planárias e girinos (KOSTADINOVA, 2005a). Estes parasitos caracterizam-se por apresentar um colar cefálico com espinhos (31-51, dependendo da

espécie), cujo número, tamanho e disposição são considerados importantes critérios taxonômicos (KANEV et al., 2009).

*Echinostoma* é considerado como um gênero problemático, especialmente pela existência de um complexo de espécies contendo 37 espinhos no colar cefálico (complexo 'revolutum'), que apresenta um elevado número de espécies descritas e tem passado por diversos arranjos taxonômicos e sinonimizicações. Em América do Sul, 14 espécies de *Echinostoma* foram reportadas até o momento (FERNANDES et al., 2015; VALADÃO et al., 2021). Destas, 11 ocorrem no Brasil: *E. barbosai*, *E. erraticum* Lutz, 1924, *E. exile* Lutz, 1924, *E. lindoense* Sandground & Boune, 1940, *E. luisreyi*, *E. mendax* Dietz, 1909, *E. microrchis* Lutz, 1924, *E. neglectum* Lutz, 1924, *E. nephrocystis* Lutz, 1924, *E. paraensei* e *E. pseudorobustum*. Já os estudos envolvendo os moluscos transmissores destes parasitos no país têm ocorrido desde o trabalho pioneiro de Lutz (1924), com a elucidação do ciclo biológico para algumas espécies. As informações disponíveis revelam a participação de *B. glabrata* como molusco transmissor de *E. barbosai*, *E. paraensei* e *E. pseudorobustum*, e *Stenophysa marmorata* de *E. luisreyi*, *E. rodriguesi* e *E. exile* (LIE; BASCH, 1966, 1967; HSU et al., 1968; MALDONADO JR. et al., 2003; PINTO; MELO, 2012; VALADÃO et al., 2021).

No presente estudo, a emergência de uma cercária identificada como *Echinostoma* sp. foi observada em *B. straminea*. A mesma foi caracterizada como apresentando um colar cefálico com 37 espinhos, e análise molecular confirmou a afiliação deste parasito como um membro do complexo 'revolutum'. Morfologicamente a larva apresenta menor tamanho das cercárias de *E. barbosai*, *E. paraensei*, *E. luisreyi* e *E. rodriguesi*. Do ponto de vista molecular, dados obtidos para o gene 28S, indicaram ser diferente das duas espécies registradas no país com dados disponíveis para comparação (*E. paraensei* e *E. pseudorobustum*). Frente a isso, a obtenção de sequências moleculares para outras espécies de *Echinostoma* relatadas no território brasileiro se faz necessária para o avanço na identificação desta cercária.

Os membros do gênero *Ribeiroia* são parasitos do esôfago e proventrículo de aves piscívoras e do trato intestinal de roedores semiaquáticos (*Ondatra zibethicus*) nas Américas e África (KOSTADINOVA, 2005). Estes parasitos são transmitidos por planorbídeos dos gêneros *Biomphalaria* e *Helisoma* (JOHNSON et al., 2004). Após emergência, a cercária necessita encontrar um peixe ou larvas de anfíbios, nos quais há a formação de metacercárias (JOHNSON et al., 2004). Na América do Norte, o processo de formação de metacercárias de *R. ondatrae* em anfíbios está associada à ocorrência de

má-formações, que incluem desenvolvimento de membros adicionais. Este processo tem sido discutido como um evento que visa favorecer a predação do anfíbio infectado e assim a infecção do hospedeiro definitivo (JOHNSON et al., 2001). Três espécies de *Ribeiroia* são reconhecidas como válidas atualmente: *R. ondatrae* no continente americano; *R. marini* (Faust & Hofflman, 1934) Basch & Sturrock, 1969 no Caribe, e *R. congolensis* Dollfus, 1950, na África (JOHNSON et al., 2004). No Brasil, parasitos adultos identificados como *R. ondatrae* já foram encontrados em diferentes espécies de aves (MONTEIRO et al., 2011; FERNANDES et al., 2015). Ressalta-se que o gênero foi descrito do Brasil tendo como espécie tipo *R. insignis* Travassos, 1939, a qual foi sinonimizada com *R. ondatrae* (JOHNSON et al., 2004; PINTO et al., 2013). Além disso, conhece-se a transmissão de *Ribeiroia* sp. por *B. straminea* na lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, obtendo espécimes adultos pela realização do ciclo experimental em *Poecilia reticulata* (segundo hospedeiro intermediário) e *Cairina moschata* (hospedeiro definitivo) (PINTO et al., 2013).

No presente estudo foi detectada a infecção de *B. straminea* por *Ribeiroia* sp., cuja cercária se caracteriza pela presença de divertículos laterais no esôfago (PINTO et al., 2013; DAVIES et al., 2015). Ressalta-se que esse planorbídeo já foi reportado na transmissão de *Ribeiroia* sp. no estado mineiro (PINTO et al., 2013). Nesta ocasião não foi possível comparar morfometricamente as larvas devido à baixa emergência de cercárias no presente trabalho. Contudo, a coespecificidade entre os isolados é provável. Os dados moleculares aqui obtidos (ITS2 e 28S) indicaram que se trata de uma espécie diferente de *R. ondatrae* e *R. marini*. A espécie encontrada no RSF possui maior similaridade com isolados reportados em *Biomphalaria pfeifferi* no Quênia (LAIDEMITT et al., 2019), mas ainda assim os dados sugerem tratar-se de uma espécie distinta. No Brasil, em estudo prévio realizado por PINTO et al. (2013), dados obtidos para o marcador ITS1 de cercárias de *Ribeiroia* encontradas em *B. straminea* de Belo Horizonte também revelaram diferenças em relação a *R. ondatrae* e *R. marini*. O mesmo resultado foi reportado para amostras obtidas de *B. tenagophila* na Argentina (DAVIES et al. 2015).

Uma quarta larva do tipo Equinocercária foi identificada, também em *B. straminea* no presente estudo. Esta cercária possui como característica morfológica diferencial a presença de um colar cefálico com 60-64 espinhos e corpo pré-faringeal contendo espinhos em roseta. Entre os gêneros da família que apresentam número de espinhos próximos e morfologia da cercária semelhante, o que mais se assemelha à larva

aqui reportada é *Patagifer* (48-64 espinhos) (KOSTADINOVA, 2005). As cercárias de *Patagifer* são mais semelhantes morfológicamente, pelo número de espinhos e pela presença de corpo-pré-faríngeal com espinhos em roseta (LAIDEMITT et al., 2019). Na Argentina, Ostrowski de Núñez (1974) reportou a infecção de *B. peregrina* por *Echinochasmus suspensum* (Braun, 1901), considerada à época como *Episthimium suspensum*. Esta larva apresenta corpo pré-faríngeal com espinhos e membrana natatória na cauda, porém, o número de espinhos do colar cefálico não foi determinado, descritos apenas como visíveis. O nome do gênero atualmente utilizado é decorrente da sinonimização de *Episthimium* com *Echinochasmus* (KOSTADINOVA; GIBSON, 2001). No entanto, é possível que esta espécie sul-americana corresponda a um outro gênero, tendo em vista que as larvas de *Echinochasmus* carecem destas estruturas e são encontradas em moluscos prosobrânquios (DHANUMKUMARI et al., 1991; SCHOLZ et al., 1996; CHOI et al., 2006).

Cercárias do tipo Megalura foram encontradas em *Aylacostoma* spp. no presente estudo. Este tipo cercariano é característico dos membros da família Philophthalmidae (ALICATA, 1962; NOLLEN & KANEV, 1995). O encistamento da cercária em substrato sólido facilitou a realização de infecções experimentais, possibilitando a obtenção de adultos para a identificação taxonômica em laboratório. A presença da forma adulta na membrana nictitante e conjuntiva de *Gallus gallus domesticus* experimentalmente infectado indicou que se tratava de uma espécie do gênero *Philophthalmus* (KANEV, 2005), o que foi confirmado pelo estudo morfológico.

Membros do gênero *Philophthalmus* são parasitos de aves e mamíferos, incluindo o homem (KANEV et al., 2005; CHALKOWSKI et al., 2021). No continente americano, 8 espécies de *Philophthalmus* foram relatadas: *P. andersoni* Dronen & Penner, 1975, *P. larsoni* Penner & Trimble, 1970, *P. hegeneri* Penner & Fried, 1963 e *P. zalophi* Dailey, Ellin & Parás, 2005, encontrados em organismos marinhos (hospedeiro intermediário ou definitivo); *P. gralli* Mathis & Leger, 1910 e *P. megalurus* (Cort, 1914) são transmitidas por moluscos dulciaquícolas; *P. lachrymosus* Braun, 1902 e *P. semipalmatus* Nasir & Díaz, 1972, ainda com hospedeiros intermediários desconhecidos (CHALKOWSKI et al., 2021). No Brasil conhecem-se relatos de *P. gralli* e *P. lacrymosus* (FREITAS, 1955; MUNIZ-PEREIRA & AMATO, 1993; PINTO et al., 2005; PINTO; MELO, 2010b, FERNANDES et al., 2015) em aves e mamíferos. Mais recentemente, foi detectada por análise molecular a transmissão de *Philophthalmus* sp. por *A. chloroticum* no Rio Paraná (ONACA et al., 2020).



*Philophthalmus* sp. nov é descrita no presente estudo com base nas características morfológicas dos estágios larvais encontrados em duas espécies de *Aylacostoma* e da forma adulta obtida experimentalmente. O estágio adulto distingue-se de espécies já reportadas no continente americano por alguns caracteres morfométricos: relação das ventosas, relação da largura da ventosa oral e faringe e tamanho dos ovos. A nova espécie é morfológicamente mais próxima a *P. megalurus*, contudo, os estágios de cercária destes parasitos são claramente distintos, especialmente pela cauda maior que possui a espécie norte-americana (WEST, 1961; MCMILLAN, 1971). Com relação ao tamanho dos ovos, Dronen e Fried (2008) concluíram através de um estudo experimental que o comprimento dos ovos é um caráter útil para diferenciar espécimes de *P. andersoni* e *P. larsoni*. Os ovos dos vermes adultos (fixados em formalina) e os de espécimes montados em lâmina do novo parasito apresentaram (em média) o mesmo comprimento, mas com leve variação na largura (43–55 vs 36–38). Isso pode ter ocorrido devido ao encolhimento dos ovos após a desidratação durante o processo de coloração. A relação das ventosas e relação da ventosa oral/faringe foram consistentes em espécimes coletados em diferentes momentos pós-infecção, o que sugere que esses caracteres podem ser úteis para a diferenciação de espécies independentemente da idade. Curiosamente, a largura da faringe da presente espécie não excede a largura da ventosa oral, ao contrário de *P. lachrymosus*, caracterizada por ter uma largura maior da faringe (FREITAS, 1955; LAMOTHE-ARGUMEDO et al., 2003).

Os resultados obtidos com o marcador *cox1*, demonstraram a ocorrência de dois haplótipos de *Philophthalmus* sp. nov, infectando *A. chloroticum* e *A. tuberculatum*. Em comparação com os dados disponíveis no GenBank, o isolado de *A. tuberculatum* foi muito semelhante (0,16%) com as sequências obtidas a partir de cercárias coletadas de *A. chloroticum* no rio Paraná (ONACA et al., 2020), localizado a 1500 km da localidade tipo da nova espécie. A sequência de 28S também foi amplificada por Onaca et al. (2020), mas o fragmento foi menor a 600 bp, sendo desconsiderado da análise filogenética. No entanto, dita sequência foi idêntica com a obtida do isolado de *A. tuberculatum*.

Quatro morfotipos do tipo xifidiocercária foram identificadas no presente estudo, todas transmitidas por espécies do gênero *Aylacostoma*. A análise filogenética realizada a partir de sequências de 28S possibilitou determinar que pertencem à superfamília Microphalloidea, na qual estão incluídos parasitos de todas as classes de vertebrados (BRAY, 2008c). Foram detectados dois membros da família Lecithodendriidae, um

pertencente à família Phaneropsolidae, e outro em que não foi possível se avançar a um nível taxonômico inferior a superfamília.

Os representantes da família Lecithodendriidae são parasitos intestinais de morcegos, mas ocasionalmente reportados em aves, com distribuição cosmopolita (LOTZ & FONT, 2008a). Sabe-se que no Brasil existem registros de 6 espécies desta família, a saber: *Castroia amplicava* Travassos, 1928, *C. silvai* Travassos, 1928, *Ochoterenatrema diminutum* (Chandler, 1938) Dubois, 1960, *Paralecithodendrium brachycolon* Freitas & Dubbon, 1960, *P. conturbatum* Freitas, 1960 e *P. cordiforme* (Braun, 1900) (FERNANDES et al., 2015). Além disso, recentemente foi reportada a transmissão de uma espécie desta família, identificada como Lecithodendriidae gen. sp., por *Melanoides tuberculata* (LOPES et al., 2021). No presente trabalho, duas xifidiocercárias encontradas foram associadas a esta família, sendo denominadas como Lecithodendriidae gen. sp. 1, transmitida por *A. chloroticum* e *A. tuberculatum*, e Lecithodendriidae gen. sp. 2, verificada apenas em *A. tuberculatum*.

Nas análises filogenéticas, Lecithodendriidae gen. sp. 1 formou um ramo isolado, mostrando-se distante do clado formado por espécies do gênero *Paralecithodendrium*. Diante disso, existe a possibilidade de se tratar de um membro do gênero que ainda não possui informações moleculares, como *Castroia* Travassos, 1928 ou *Ochoterenatrema* Caballero, 1943, ou talvez, um gênero ainda não descrito. No caso de Lecithodendriidae gen. sp. 2, foi observado que se encontra inserido em um clado conformado por espécies de *Paralecithodendrium*, verificando também nele a presença do isolado de Lecithodendriidae gen. sp. reportado em *M. tuberculata* no país (LOPES et al., 2021). Contudo, não foi recuperado o monofiletismo do gênero *Paralecithodendrium*, observando que *P. hurkovaee* apresenta mais afinidade com *Pycnopus* spp. Isto já foi discutido por Tkach et al. (2003), sugerindo a criação de um novo gênero para esse parasito. Sendo assim, frente as incógnitas existentes dentro da família Lecithodendriidae, a identificação dos presentes trematódeos foi até essa categoria taxonômica até que novos estudos sejam realizados, incluindo o encontro e caracterização molecular dos respectivos parasitos adultos.

A família Phaneropsolidae está constituída por parasitos intestinais de mamíferos, aves, raramente répteis (LOTZ & FONT, 2008b). No Brasil 5 espécies desta família já foram relatadas: *Limatum oklahomense* Macy, 1932, *Maxbraunium tubiporum* (Braun, 1900) Caballero & Zerecero, 1942, *Phaneropsolus inquassatus* (Gomes & Pinto, 1972), *P. orbicularis* (Diesing, 1850) Braun, 1901 e *Postorchigenes paraguayensis* (Fischthal &

Martin, 1978) (FERNANDES et al., 2015). No presente estudo foi detectada a transmissão de uma espécie de Phaneropsolidae por *A. chloroticum* e *A. tuberculatum*. Além do encontro da cercária nestes tiarídeos, metacercárias da mesma espécie foram recuperadas em larvas de Odonata, aqui registrado como um segundo hospedeiro intermediário natural. O número de sequências moleculares disponíveis para os representantes dessa família é baixo e apenas um único isolado foi identificado até o nível de espécie [*Phaneropsolus praomidis*, espécie parasito de *Praomys tullbergi* (Rodentia: Muridae) no continente africano (BAER, 1971)]. Assim, a ausência de dados moleculares é um empecilho para a realização do link destas cercárias com o respectivo parasito adulto.

A escassez de informações moleculares pode impossibilitar a identificação até mesmo de categorias superiores como família. Este caso foi verificado no quarto membro da superfamília Microphalloidea verificado neste estudo. A xifidiocercária encontrada em *A. chloroticum* caracteriza-se pela presença de gotículas de gordura no corpo. Larvas com estas características são aqui registradas pela primeira vez no Brasil. Considerando larvas com esta característica encontradas em outros países, as cercárias encontradas em Januária diferencia-se pela ausência de órgão virgula e disposição de glândulas de penetração quando comparada com outras já relatadas nos EUA (SEITNER, 1945) e na Rússia (SHCHENKOV et al., 2020). Destas, apenas as identificadas na Rússia (*Cercaria cristatella* H, *C. cristatella* F, *C. nigrospora* e *C. vorskla* V) possuem dados moleculares para comparação, mas os dados obtidos pelas análises filogenéticas não revelaram proximidade com este isolado do Brasil. Apesar de diferentes espécies da superfamília Microphalloidea terem sido incluídos nas análises, não foi possível definir com clareza a relação das larvas estudadas com nenhum dos gêneros com dados disponíveis para comparação.

A superfamília Opisthorchioidea é um grupo amplamente estudado, estando constituída por três famílias: Cryptogonimidae, Heterophyidae e Opisthorchiidae (BRAY, 2008a). As cercárias destes parasitos caracterizam-se por possuir cauda simples, alguns com membrana natatória, sendo classificadas como pertencentes ao tipo Pleurolofocerca (PINTO, 2019). No presente estudo, 5 morfotipos desse tipo cercariano foram detectados em *Aylacostoma* spp., sendo três pertencente à família Cryptogonimidae, e dois, à Heterophyidae.

A família Cryptogonimidae é constituída por parasitos intestinais de peixes e répteis, raramente de anfíbios (MILLER; CRIBB, 2008). No RSF, os estudos

relacionados a peixes são diversos, e conhece-se a presença de 4 criptogonimídeos: *Acanthostomum gnerii* Szidat, 1954, *Neocladocystis intestinalis*, *Pseudosellacotyla lutzi* e *Palaeocryptogonimus claviformis* Szidat, 1954 (BRASIL-SATO, 2002; BRASIL-SATO; SANTOS, 2005; CORRÊA; BRASIL-SATO, 2008; COSTA et al., 2015). Neste estudo, foi possível detectar a transmissão de três membros desta família, exclusivamente por *A. tuberculatum*: *Neocladocystis* sp., *P. lutzi* e uma espécie identificada até o nível de família.

*Pseudosellacotyla lutzi* é a única espécie do gênero, sendo encontrada parasitando o intestino e ceco pilórico de *Hoplias* spp. na Argentina, Brasil e Colômbia (FERNANDES; KOHN, 2001; PÉREZ-CAICEDO et al., 2010; QUINTANA; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2014). A posição filogenética deste parasito tem sido problemática, sendo considerada como um representante da família Faustulidae Poche, 1926 por Bray (2008d). Posteriormente, Quintana e Ostrowski de Núñez (2014) propuseram a incorporação de *P. lutzi* na família Cryptogonimidae, o que recebeu suporte filogenético após as análises moleculares realizadas por Pantoja et al. (2018). A disponibilidade de informação molecular possibilitou a identificação do molusco transmissor (*A. chloroticum*) no rio Paraná, no estado de Mato Grosso (ONACA et al., 2020).

No presente estudo, *A. tuberculatum* é reportado como primeiro hospedeiro intermediário de *P. lutzi* no RSF. As cercárias foram utilizadas para a infecção de exemplares de *Poecilia reticulata*, e as metacercárias apresentaram características morfológicas e sítio de infecção semelhantes ao reportado por Quintana e Ostrowski de Núñez (2014). Adicionalmente, a forma adulta do parasito foi recuperada de um exemplar de *H. malabaricus* infectado naturalmente. As sequências do estágio adulto e da cercária foram idênticas, suportando a coespecificidade entre estes diferentes estágios evolutivos. O presente estudo representa o registro de *A. tuberculatum* como um novo hospedeiro intermediário envolvido na transmissão de *P. lutzi*.

Os membros do gênero *Neocladocystis* Manter & Pritchard, 1969 são parasitos intestinais de peixes (Cichlidae, Characidae, Bagridae, Latidae) de água doce encontrados na África e América do Sul (MILLER; CRIBB, 2008; KMENTOVÁ et al., 2020). Atualmente, o gênero é constituído por 5 espécies: *N. bamba*, *N. biliaris*, *N. congoensis* (KMENTOVÁ et al., 2020), *N. intestinalis* e *N. tanganyikae* (Prudhoe, 1951) Manter & Pritchard, 1969. Destas, *N. intestinalis* tem sido relatada em *Salminus* spp. apenas na Argentina e Brasil (KOHN et al., 2007; QUINTANA; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2016),

e *A. chloroticum* atua como primeiro hospedeiro intermediário no primeiro país. No RSF, *S. brasiliensis* já foi reportado como hospedeiro definitivo desta espécie (BRASIL-SATO, 2002). No presente estudo, *A. tuberculatum* foi encontrado infectado por cercárias de *Neocladocystis* sp. Esta identificação foi possibilitada pela comparação molecular entre as larvas encontradas no tiarídeo e exemplares adultos de *N. intestinalis* recuperados em *S. franciscanus*. Embora a análise de sequências 28S obtidas para ambos os estágios evolutivos tenham revelando uma divergência molecular de (0,9%), sugerindo tratar-se de espécies distintas, a análise filogenética revelou o agrupamento entre estes isolados simpátricos, até que novas análises sejam realizadas, estes parasitos são considerados como espécies distintas, mas pertencentes ao mesmo gênero. Interessantemente, ambos parasitos diferem significativamente de *N. bamba*, *N. biliaris* e *Neocladocystis* sp. relatados na África (KMENTOVÁ et al., 2020), não existindo suporte para que estas espécies de parasitos de peixes ocorrentes em diferentes continentes sejam cogenéricas. Tendo em vista que a espécie tipo do gênero, *N. tanganyikae*, foi descrita na África, *N. intestinalis* deve ser alocado em um gênero diferente, possivelmente de ocorrência exclusiva na América do Sul. Assim, estudos futuros, incluindo a pesquisa de parasitos em *Salminus* spp. do RSF, a realização de novas coletas malacológicas, e a obtenção de sequências de marcadores mitocondriais das amostras já existentes, são necessárias para se preencher as lacunas que ainda persistem na identificação destes parasitos.

O terceiro criptogonimídeo detectado em *A. tuberculatum* neste estudo possui cercária maior do que a observada para as larvas de *Neocladocystis* sp. Metacercárias foram obtidas experimentalmente em *P. reticulata*, as quais apresentam algumas características morfológicas (corpo alongado, tegumento espinhoso, ventosa oral em forma de funil com coroa de espinhos, faringe em forma de barril) que a aproximam de *Annakohniella travassosi*, única espécie do gênero descrita em *Rhaphiodon vulpinus* no estado de Tocantins (FERNANDES et al., 2013). Não obstante, por se tratar de uma forma larval, realizou-se a identificação até o nível de família. Cabe ressaltar que através da análise filogenética, os três criptogonimídeos encontrados no estudo formaram um único clado, porém, com baixos valores de suporte. O sequenciamento de outros membros da família na América do Sul, incluindo *Annakohniella travassosi*, permitirá avançar na identificação destas cercárias. Além disso, em um contexto mais amplo, estas informações são necessárias para o melhor conhecimento da história evolutiva e dispersão transcontinental dos representantes da família Cryptogonimidae.

A família Heterophyidae está constituída por parasitos intestinais de mamíferos e aves, com ampla distribuição mundial. Dos 36 gêneros que formam parte desta família, 13 apresentam importância na saúde pública no continente asiático devido ao consumo frequentemente de peixe cru, onde encontram-se encistadas as metacercárias (CHAI, 2007; PEARSON, 2008; CHAI; JUNG, 2017). No Brasil, já foram relatadas espécies dos seguintes gêneros: *Acanthotrema* Travassos, 1928, *Ascocotyle* Looss, 1899, *Centrocestus* Looss, 1899, *Cryptocotyle* Lühe, *Galactosomum* Looss, 1899, *Haplorchis* Looss, 1899, *Opisthometra* Poche, 1926 e *Pygidiopsis* Looss, 1907 (FERNANDES et al., 2015; LOPES et al., 2020). No presente estudo foram detectados dois heterofídeos: *Centrocestus formosanus* e Heterophyidae gen. sp. transmitidos por *M. tuberculata* e *A. chloroticum*, respectivamente.

*Centrocestus formosanus* é uma espécie invasora já relatada em moluscos, peixes e aves no território brasileiro (PINTO; MELO, 2010a; PAULA-ANDRADE et al., 2012; XIMENES et al., 2017; CICCHETO et al., 2021b). É importante destacar o potencial zoonótico de *C. formosanus*, já registrado em humanos na Ásia por diferentes autores (CHAI et al., 2013; CHAI; JUNG, 2020). Além disso o potencial de envolvimento em prejuízos a piscicultura já foi caracterizado (MITCHELL et al., 2005). Estes fatos merecem atenção na área de estudo, tendo em vista que os peixes são uma importante fonte de alimentação da população. Apesar da ocorrência deste parasito já ter sido registrada em diferentes localidades do Brasil, este é o primeiro registro de sua ocorrência no RSF. Já o outro heterofídeo observado neste rio, é filogeneticamente próximo de *Opisthometra planicollis* (Rudolphi, 1819) Poche, 1926. Contudo, esta espécie ocorre em ambiente marinho, tendo sido registrada no país em *Pelecanus occidentalis* e *Sula leucogaster* (FERNANDES et al., 2015). Recentemente, Ostrowski de Núñez et al. (2020) reportaram a infecção de *A. chloroticum* pelo heterofídeo *Heterophyes yacoretana* no Rio Paraná, na Argentina. Porém, a larva desta espécie caracteriza-se pelo corpo cercariano mais alongado (vs. ovalado) e membrana natatória mais desenvolvida. Este corresponde ao segundo registro da atuação de *A. chloroticum* como primeiro hospedeiro intermediário de um membro da família Heterophyidae na América do Sul.

A superfamília Plagiorchioidea engloba um amplo grupo de parasitos do sistema digestivo, respiratório ou urinário com espécies encontradas em todas as classes de vertebrados (BRAY, 2008b). Entre as várias famílias que compõem este táxon encontra-se a família Plagiorchiidae, que possui taxonomia complexa e controversa, não existindo critérios claros de diagnose. Além disso, estudos filogenéticos têm demonstrado que se

trata de um grupo parafilético, o que dificulta estimar o número exato de gênero incluídos nesta família (TKACH, 2008; PÉREZ-PONCE DE LEÓN; HERNÁNDEZ-MENA, 2019; SULEMAN et al., 2019).

Entre os integrantes da família Plagiorchiidae se encontram as espécies do gênero *Choledocystus*, parasitos da vesícula biliar, ducto biliar e fígado de anfíbios neotropicais (TKACH, 2008). Atualmente, sete espécies são consideradas válidas: *C. elegans* (Travassos, 1926) Pereira & Cuocolo, 1941, *C. hepaticus* (Lutz, 1928), *C. incurvatum* Sullivan, 1976, *C. intermedius* Caballero, Bravo & Cerecero, 1944, *C. pseudium* (Mañé-Garzón & Holeman-Spector, 1967), *C. simulans* Razo-Mendivil, León-Règagnon & Ponce de León, 2006, e *C. vitellinophilum* (Dobbin Jr., 1958) (FERNANDES; KOHN, 2014; GOMES et al., 2017; HAMANN et al., 2020). Entre elas, no território brasileiro conhecem-se os reportes de *C. elegans*, *C. incurvatum* e *C. vitellinophilum* (FERNANDES; KOHN, 2014; GOMES et al., 2017, QUEIROZ, 2020). Durante as coletas realizadas para este trabalho, foram encontrados exemplares de Ancylineae gen. sp. infectados por *Choledocystus* sp. A cercária apresenta semelhança morfológica com as larvas de *Glythelmins* spp. (MARTIN, 1969; SULLIVAN; BYRD, 1970), porém possui estruturas menores. A identificação do parasito foi possibilitada por meio da análise filogenética do marcador ribossomal 28S. Com auxílio do gene *cox1*, foi verificado que é uma espécie diferente de *C. hepaticus* e *C. incurvatum*, únicas espécies do gênero com sequências moleculares disponíveis para comparação. A futura obtenção de sequências moleculares de *C. elegans* e *C. vitellinophilum* permitirá identificar se corresponde à cercária de uma dessas espécies. Destaca-se que este é o primeiro registro do hospedeiro intermediário de um membro do gênero *Choledocystus*.

Outros dois tipos cercarianos apresentando caudas simples foram encontradas em *B. straminea*: larvas do tipo Anfistoma identificadas como *Zygocotyle lunata* (superfamília Paramphistomoidea) e larvas do tipo Monostoma, identificadas como Notocotyliidae gen. sp. (superfamília Pronocephaloidea). No ciclo biológico destes grupos há a formação de metacercárias externamente em algum substrato sólido, não existindo a participação de um segundo hospedeiro intermediário.

*Zygocotyle lunata* é um único parasito descrito para o gênero, sendo encontrado principalmente em aves aquáticas, e raramente mamíferos das Américas (FRIED et al., 2009). Moluscos de dois gêneros da família Planorbidae, *Biomphalaria* na América do Sul, e *Helisoma*, na América do Norte (FRIED et al., 2009; ALVES et al., 2020), já foram incriminados como responsáveis pela transmissão deste trematódeo. Diante da facilidade

de se obter a forma infectante para hospedeiros definitivos, estudos experimentais visando recuperar a forma adulta em diversos hospedeiros (roedores e aves) têm sido realizados por diferentes autores (OSTROWSKI DE NÚÑEZ et al., 2003; FRIED et al., 2009; BARBOSA et al., 2011). No Brasil, a transmissão de *Z. lunata* por *B. straminea* foi reportada por Barbosa et al. (2011) em lagoas próximas ao RSF, no município de Iguatama. Posteriormente, foi relatada a infecção do mesmo planorbídeo na cidade de Belo Horizonte por Alves et al. (2020). No presente estudo, a realização de infecção experimental de camundongos possibilitou a obtenção de adultos, os quais apresentaram morfologia compatível com *Z. lunata* (OSTROWSKI DE NÚÑEZ et al., 2003; BARBOSA et al., 2011).

Já os membros da família Notocotylidae são parasitos cosmopolitas do trato digestivo, comumente do ceco de aves ou mamíferos, agrupados em 13 gêneros (BARTON; BLAIR, 2005). Sabe-se que no Brasil 4 espécies dessa família já foram registradas: *Hippocrepis hippocrepis*, *Notocotylus breviserialis* Stunkard, 1967, *Ogmogaster antarcticus* Johnson, 1931 e *Paramonostomum ionorme* Travassos, 1921 (FERNANDES et al., 2015). No presente estudo, a determinação do tipo cercariano como Monostoma já era um indicativo de que o parasito se tratava de um representante da família Notocotylidae, o que foi corroborado pela análise filogenética envolvendo sequências do gene 28S. Verificou-se uma maior proximidade com espécies de *Pseudocatropis* e *Quinqueserialis* reportadas na Rússia (IZRAILSKAIA et al., 2019) e no Canadá (GAGNON; DETWILER, 2019; GAGNON et al., 2021), contudo, com baixos valores de suporte nodal, impossibilitando o avanço na identificação taxonômica destas larvas. Interessantemente, foi observado a formação de um clado constituído por outras espécies de Notocotylidae transmitidas por planorbídeos (*Pseudocatropis*, *Quinqueserialis*, *Notocotylus* e *Hippocrepis*). Ressalta-se ainda que o gênero *Notocotylus* Diesing, 1839 não foi recuperado como monofilético, sendo observado a presença de um clado formado por espécies transmitida por moluscos pulmonados, e outro, por prosobrânquios. A inexistência de sequências moleculares para a espécie tipo do gênero (*N. triserialis*, Diesing, 1839) impossibilita esclarecer qual destes clados correspondem realmente ao gênero *Notocotylus*. A escassez de sequências para os representantes neotropicais desta família e as elevadas divergências em relação aos membros dos gêneros *Hippocrepis* e *Paramonostomum*, não permitiram uma identificação mais aprofundada destas cercárias aqui registradas pela primeira vez no Brasil.



Cinco morfotipos de furcocercárias, com furcas menores ao tronco caudal (brevifurcadas), foram detectadas no presente estudo. As análises filogenéticas possibilitaram determinar que pertencem a superfamília Schistosomatoidea, constituídos por representantes das famílias Aporocotylidae (duas espécies), Schistosomatidae (duas espécies) e Spirorchiidae (uma espécie).

A família Aporocotylidae é constituída por parasitos cosmopolitas, que se localizam no sistema circulatório de peixes, tanto de ambientes marinhos quanto dulciaquícolas (SMITH, 2002). Aspectos nomenclaturais relacionados a categoria de família destes parasitos têm sido controversos e disputado ao longo do tempo, sendo a sua inclusão em Sanguinicolidae von Graff, 1907 apresentada por Smith (2002). Contudo, mais recentemente, foi verificado que Sanguinicolidae é sinônimo júnior de Aporocotylidae (BULLARD, 2009). Estes parasitos são transmitidos por pulmonados e prosobrânquios (OLSON et al., 2003; BRANT et al., 2006), existindo também registros de espécies transmitidas por moluscos bivalves e anelídeos (poliquetas) (GILARDONI et al., 2011; SUGIHARA et al., 2014; CRIBB et al., 2017). Estudos envolvendo a elucidação de ciclos biológicos das espécies que ocorrem em ambientes de água doce são escassos em comparação com as espécies marinhas (CRIBB et al., 2017). No Brasil apenas duas espécies de aporocotilídeos foram registradas em peixes dulciaquícolas: *Plehnella coelomica* Szidat, 1951 e *P. platyrhynchi* (Guidelli, Isaac & Pavanelli, 2002) (KOHN et al., 2007), destacando que a primeira já foi reportada em *Pimelodus maculatus* no RSF (BRASIL-SATO; PAVANELLI, 2004). No presente estudo foram identificados por meio de análise filogenética do marcador 28S dois membros da família Aporocotylidae: Aporocotylidae gen. sp. 1 transmitido por *B. straminea*, e Aporocotylidae gen. sp. 2, por *A. tuberculatum*.

Na árvore filogenética recuperada foi observado que ambos os parasitos se encontram em um clado formado exclusivamente por espécies procedentes de ambientes de água doce, com exceção de *Acipensericola* spp. e dois parasitos detectados na África através de estudos malacológicos (BRANT et al., 2006). Por outro lado, também foi evidenciada a formação de um clado exclusivamente por aporocotilídeos de peixes marinhos e transmitidos principalmente por poliquetas, também com um alto suporte. As relações com outras famílias de Schistosomatoidea (Schistosomatidae e Spirorchiidae) apresentaram baixos suportes, porém, suspeita-se de uma possível parafilia da família, principalmente pelos clados constituídas por espécies de ambientes marinhos e de água

doce. Isto poderá ser avaliado futuramente considerando a caracterização molecular de aporocotilídeos procedentes hospedeiros definitivos dulciaquícolas.

Enquanto as características morfológicas das larvas, não foram comparadas morfometricamente por corresponder a diferentes morfotipos, onde Aporocotylidae gen. sp. 2 possui membranas natatórias nas furcas e um par de ocelos, ausentes em Aporocotylidae gen. sp. 1. Foi encontrada similaridade morfológica apenas para Aporocotylidae gen. sp. 2 com a larva de um parasito transmitido por um tiarídeo no continente asiático, porém, identificado erradamente como um membro da família Strigeidae (NAMCHOTE et al., 2015). Além disso, ambos morfotipos distinguem-se de *Sanguinicola* spp., transmitidos por prosobrânquios (EVANS; HECKMANN, 1973; SCHELL, 1974; KIRK; LEWIS, 1993) pela ausência de membrana ondulante no corpo cercariano. Torna-se necessário a obtenção de sequências moleculares de *Phleniella* spp. reportadas no Brasil para determinar se existe correspondência com uma destas cercárias encontradas no RSF.

Os membros da família Schistosomatidae são parasitos do sistema vascular de aves e mamíferos, ocasionalmente répteis com distribuição cosmopolita (KHALIL, 2002). Nesta família estão incluídas as espécies do gênero *Schistosoma*, as quais possuem grande importância médica em diferentes continentes (África, Ásia e América do Sul), e mesmo no Brasil, onde a infecção por *Schistosoma mansoni* constitui ainda um problema de saúde pública (MORGAN et al., 2001; SONG et al., 2016; KATZ, 2018). Além disso, a dermatite cercariana produzida por esquistossomatídeos de aves tem adquirido importância, sendo considerada como uma doença emergente (KOLÁŘOVÁ et al., 2013). Este grupo de parasitos são transmitidos por moluscos pulmonados das famílias Physidae, Lymnaeidae e Planorbidae (PINTO et al., 2012) e caenogastrópodos marinhos (BRANT et al., 2010), e suas cercárias caracterizam-se pela presença de um par de ocelos pigmentados e membrana natatória nas furcas.

Quatro espécies de esquistossomatídeos já foram reportadas em aves no Brasil: *Dendritobilharzia anatinarum* Cheatum, 1941, *Macrobilharzia macrobilharzia* Travassos, 1922, *Ornithobilharzia canaliculata* (Rudolphi, 1849) Odhner, 1912 e *Trichobilharzia jequitibaensis* Leite, Costa & Costa, 1978 (FERNANDES et al. 2015). Destas, sabe-se que *T. jequitibaensis* é transmitido por *Aplexa rivalis* (Physidae) e *Pseudosuccinea columella* (Lymnaeidae) (LEITE et al., 1978) e *D. anatinarum* por *B. straminea* (LEITE et al., 1982). Nos últimos anos, registros adicionais foram realizados como o auxílio de ferramentas moleculares, incluindo o relato da transmissão de

*Trichobilharzia* sp. por *Stenophysa marmorata* no estado do Espírito Santo (PINTO et al., 2014), e de um provável novo gênero desta família detectado em *B. glabrata* (PINTO et al., 2017) na mesma cidade deste estudo (Januária). No presente estudo, pelas características das larvas e análise molecular, foram identificados dos esquistossomatídeos de aves, ambos transmitidos por *B. straminea*. Schistosomatidae gen. sp. 1 apresentou 100% de identidade com o parasito previamente encontrado por Pinto et al. (2017). Um novo hospedeiro intermediário natural (*B. straminea*) é registrado para este parasito que aguarda a obtenção dos respectivos adultos para sua descrição. A morfologia do ovo (obtido experimentalmente) por Pinto et al. (2017) é diferente de gêneros existentes, contudo semelhante a uma espécie previamente identificada, a partir dos ovos no Brasil como *Schistosoma pirajai*.

No caso de Schistosomatidae gen. sp. 2, a situação verificada nas análises filogenéticas foi semelhante, não sendo possível a associação com gêneros já reportados no país (*Dendritobilharzia*, *Macrobilharzia*, *Ornithobilharzia* e *Trichobilharzia*). O parasito apresentou proximidade com um esquistossomatídeo de ave não identificado encontrado em *Biomphalaria sudanica* no Quênia (BRANT et al., 2006), sendo provável que estes isolados pertençam ao mesmo gênero. Além disso, a relação entre o tronco caudal e as furcas possibilitou diferenciá-la de *Trichobilharzia* sp. registrada no Brasil (PINTO et al., 2014). Futuros estudos são necessários para se avançar na identificação deste parasito, o que poderá ser alcançado com o encontro de parasitos adultos no hospedeiro definitivo, ou em trabalhos experimentais realizados a partir de um novo encontro do molusco transmissor infectado. Neste último caso, ressalta-se que o baixo número de cercárias eliminadas pelo planorbídeo é um empecilho para este tipo de ensaio.

Os representantes da família Spirorchiidae são parasitos do sistema vascular, linfático e nervoso de tartarugas marinhas e dulciaquícolas encontrados em todo o mundo. (PLATT, 2002; SNYDER, 2004). Estudos moleculares revelaram um cenário complexo do ponto de vista taxonômica, uma vez que a parafilia do grupo tem sido demonstrada por diferentes autores (SNYDER, 2004; PINTO et al., 2015b; PÉREZ-PONCE DE LEÓN & HERNÁNDEZ-MENA, 2019). No território brasileiro existem relatos de espécies dos gêneros *Amphiorchis*, *Carettacola*, *Learedius* e *Monticellius*, todos encontrados em tartarugas marinhas (FERNANDES; KOHN, 2015). Já em ambientes dulciaquícolas, há registros da participação de *Biomphalaria* spp. e *Pomacea* sp. na transmissão de parasitos desta família em Minas Gerais e no Paraná, (PINTO et al., 2015b; CICHETO et al., 2021a; MESQUITA et al., 2021). Os dados moleculares sugerem tratar-se de novos

gêneros e espécies que aguardam o encontro dos parasitos adultos para serem formalmente descritos (PINTO et al., 2015b).

No presente estudo foi detectada a infecção de *B. straminea* e *B. occidentalis* por Spirorchiidae gen. sp. Na análise filogenética para o gene 28S, foi verificada a formação de um clado por espirorquídeos reportados em ambientes dulciaquícolas na América do Sul. Estes isolados se apresentaram como grupo irmão de representantes da família encontrados em hospedeiros marinhos. É possível que espirorquídeo encontrado no RSF, juntamente com Spirorchiidae sp. 1 e Spirorchiidae sp. 2 detectados em *Biomphalaria* spp. por Pinto et al. (2015b), pertençam a um mesmo gênero, e possivelmente a diferente espécie devido a baixa variabilidade genética reportada pelo autor através do marcador 28S (0,1%). A obtenção de sequências de genes mitocondriais destes isolados é necessária para essa confirmação de dita hipótese. Já o espirorquídeo relatado em *B. occidentalis* no Paraná (CICCHETO et al., 2021a), apresentou maior proximidade com *Atamatam amazonensis*, novo gênero e espécie descritos de *Chelus fimbriata* do Rio Amazonas, Peru (BULLARD et al., 2019). Adicionalmente, *Paratamatam iquitosiensis* descrita por Bullard et al. (2019) na mesma espécie de quelônio, e *Pitiutrema revelae* encontrado em *Podocnemis sextuberculata* por Dutton et al. (2019) também na Amazônia peruana, diferem molecularmente das larvas já registrada no estado de Minas Gerais. Novos estudos envolvendo a caracterização de espirorquídeos relatados na América do Sul são necessários e poderão indicar que este grupo pertence a uma família distinta.

Apesar das diversas cercárias encontradas em moluscos do RSF no presente estudo, dados obtidos em peixes indicam a ocorrência de no mínimo outras quatro espécies de trematódeos na área de estudo: *Apharyngostrigea* sp., Crassiphialinae gen. sp., *Posthodiplostomum nanum* e *N. intestinalis*. Contudo, os moluscos transmissores desses parasitos não foram detectados durante o estudo malacológico. Presumivelmente, *B. straminea* seja o primeiro hospedeiro intermediário de *Apharyngostrigea* sp., tendo em vista que esta espécie já foi reportada infectada por *A. pipientis* e *A. simplex* no estado mineiro (LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019; LOCKE et al., 2021). Semelhantemente, moluscos planorbídeos, *B. straminea* e Ancyliinae gen. sp., são os prováveis hospedeiros de Crassiphialinae gen. sp. e *P. nanum*, respectivamente, como já registrado em Belo Horizonte (LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2018, 2019). Embora novos estudos sejam necessários, a ocorrência de *Apharyngostrigea* sp. e *P. nanum* são aqui registrados pela primeira vez em peixes do RSF. Já as formas adultas de *N. intestinalis* obtida de *Salminus* sp. está de acordo com as descrições de Travassos et al. (1969) e Quintana & Ostrowski

de Núñez (2016) e como já comentado, novos estudos avaliando molecularmente larvas semelhantes à aqui identificadas como *Neoclado cystis* sp. são necessários.

Entre os parasitos identificados no presente trabalho, *C. formosanus* e *Philophthalmus* sp. nov apresentam potencial zoonótico devido ao consumo de peixes por parte de população e a realização de atividades de lazer (nado) em ambientes lênticos, respectivamente. Embora a prevalência dos parasitos nos seus respectivos moluscos foi baixa, casos humanos não devem ser desestimados. Estudos sobre trematódeos transmitidos por *A. chloroticum* vem sendo realizados no Rio Paraná, Argentina, destacando a espécie *H. yacyretana*, pelo fato de que alguns membros do gênero *Heterophyes* infectam ao homem, principalmente na Ásia pelo consumo de peixe cru (CHAI; JUNG, 2017). Frente a isso, *Philophthalmus* sp. nov trata-se da segunda espécie transmitida por *A. chloroticum* com potencial zoonótico em América do Sul e a quinta cujo ciclo de vida foi elucidado experimentalmente (OSTROWSKI DE NÚÑEZ & QUINTANA, 2008; QUINTANA & OSTROWSKI DE NÚÑEZ, 2014, 2016; OSTROWSKI DE NÚÑEZ et al., 2020). Além disso, esses achados tornam importante a execução de futuras pesquisas parasitológicas com membros do gênero *Aylacostoma*, pouco estudados no Brasil apesar do número de espécies existentes no território (n=33) (SIMONE, 2006).

Das 27 espécies de trematódeos que ocorrem no RSF e que foram apresentadas na tabela 1, apenas no presente estudo foram identificados os moluscos transmissores para duas (*Austrodiplostomum compactum* e *Pseudosellacotyla lutzi*) o que salienta futuras coletas com a finalidade de identificar aos primeiros hospedeiros intermediários dos restantes. Adicionalmente, os resultados obtidos neste trabalho também revelaram uma rica fauna de trematódeos sendo transmitidas por moluscos no RSF e em cujos ciclos biológicos, outros vertebrados diferentes a peixes estariam envolvidos como hospedeiros definitivos.

Por fim, novas interações biológicas foram registradas neste tipo de ambiente que é ainda pouco explorado no país do ponto de vista de pesquisas envolvendo a integração das áreas de malacologia e helmintologia. Por outro lado, a complexidade inerente ao estudo de larvas de trematódeos encontradas em moluscos é demonstrada. Apesar da aplicação e contribuições da taxonomia molecular, a ausência de sequências referências para a maioria das espécies de trematódeos neotropicais torna-se um empecilho para a associação entre as larvas e os respectivos adultos. Contudo, ainda que avanços sejam necessários para a identificação em nível específico, as informações por ora obtidas, além

de representar novos registros de espécies, hospedeiros e localidades para os parasitos encontrados, apontam, na maioria dos casos, os grupos dos demais hospedeiros e mecanismos de transmissão envolvidos nos complexos ciclos de vida. Assim, os dados obtidos demonstram um caminho longo e desafiador que necessita ser percorrido para um maior conhecimento da biologia e taxonomia dos trematódeos que ocorrem no Brasil.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante as coletas malacológicas realizadas no rio São Francisco, Januária, Minas Gerais demonstram a presença de uma rica diversidade de trematódeos digeneicos neste importante rio do Brasil. O estudo morfológico e molecular das cercárias emergidas dos moluscos permitiu a identificação de 31 larvas de trematódeos ocorrendo em moluscos na área. Assim, as seguintes conclusões puderam ser obtidas a partir dos resultados:

- *Biomphalaria straminea* atua como primeiro hospedeiro intermediário de Aporocotylidae gen. sp. 1, *Austrodiplostomum compactum*, *Clinostomum heluans*, *Cotylurus* sp., *Drepanocephalus* sp., *Echinostoma* sp., Echinostomatidae gen. sp., *Hysteromorpha* sp., Notocotylidae gen. sp., *Parastrigea* sp., *Ribeiroia* sp., Schistosomatidae gen. sp. 1 e Schistosomatidae gen. sp. 2, Spirorchiidae gen. sp. 2, *Tylodelphys* sp. e *Zygocotyle lunata*, sendo algumas destas interações registradas pela primeira vez.
- *Biomphalaria occidentalis* é hospedeiro intermediário de Spirorchiidae gen. sp.
- *Aylacostoma tuberculatum* atua como hospedeiro intermediário de Aporocotylidae gen. sp. 2, Cryptogonimidae gen. sp., Echinochasmidae gen. sp., Lecithodendriidae gen. sp. 1, Lecithodendriidae gen. sp. 2, *Neocladocystis* sp., Phanerosolidae gen. sp., *Philophthalmus* sp. nov., *Pseudosellacotyla lutzi*, *Stephanoprora* sp. 1 e *Stephanoprora* sp. 2, sendo o envolvimento desta espécie em ciclos de trematódeos registrado pela primeira vez.
- *Aylacostoma chloroticum* participa no ciclo biológico de Heterophyidae gen. sp., Lecithodendriidae gen. sp., Phanerosolidae gen. sp. e *Philophthalmus* sp. nov.
- Ancylineae gen. sp. é o primeiro hospedeiro intermediário de *Choledocystus* sp, sendo o primeiro registro para parasitos desse gênero.
- *Melanoides tuberculata* é transmissor de *Centrocestus formosanus*.
- *Biomphalaria straminea* atua como segundo hospedeiro intermediário de *Cotylurus* sp. e Echinostomatidae gen. sp. na localidade.
- *Pseudosuccinea columella* e *Stenophysa marmorata* são reportadas pela primeira vez no Rio São Francisco.

Adicionalmente, ressaltam-se as seguintes conclusões obtidas da pesquisa de trematódeos em outros hospedeiros:

- As larvas de Odonata são segundos hospedeiros intermediários de *Phaneropsolidae* gen. sp.
- Girinos de *Rhinella* sp. são os segundos hospedeiros intermediários envolvidos no ciclo natural de *Parastrigea* sp.
- *Australoheros* sp. é segundo hospedeiro intermediário de *Austrodiplostomum compactum* e *Clinostomum heluans*.
- *Myleus pacu* é um segundo hospedeiro natural de *Cryptogonimidae* gen. sp.
- *Hoplias malabaricus* é hospedeiro definitivo de *P. lutzii* na localidade.
- *Poecilidae* gen. sp. é segundo hospedeiro intermediário de *A. compactum* e *Posthodiplostomum nanum*.



## 8 REFERÊNCIAS

ACHATZ, T. J.; MARTENS, J. R.; KOSTADINOVA, A.; PULIS, E. E.; ORLOFSKE, S. A.; BELL, J. A.; FECCHIO, A.; OYARZÚN-RUIZ, P.; SYROTA, Y. Y.; TKACH, V. V. Molecular phylogeny of *Diplostomum*, *Tylodelphys*, *Austrodiplostomum* and *Paralaria* (Digenea: Diplostomidae) necessitates systematic changes and reveals a history of evolutionary host switching events. **International Journal for Parasitology**, vol. 52, n. 1, p. 47-63, 2022.

ACOSTA, A. A.; CAFFARA, M.; FIORAVANTI, M.; UTSUNOMIA, L.; ZAGO, A. C.; FRANCESCHINI, L.; SILVA, R. J. Morphological and molecular characterization of *Clinostomum detrunctum* (Trematoda: Clinostomidae) metacercariae infecting *Synbranchus marmoratus*. **Journal of Parasitology**, vol. 102, n. 1, p. 151-156, 2016.

ALBURQUERQUE, M. C.; SANTOS-CLAPP, M. D.; BRASIL-SATO, M. C. Endoparasites of two species of forage fish from the Três Marias reservoir, Brazil: new host records and ecological indices. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, vol. 38, suppl. 3, p. 139-145, 2016.

ALICATA J. E. Life cycle and developmental stages of *Philophthalmus gralli* in the intermediate and final hosts. **Journal of Parasitology**, vol. 48, p. 47-54, 1962.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, vol. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVES, F.; SILVEIRA, L. F.; SOUZA, E. A. O conhecimento ornitológico na bacia hidrográfica do Rio São Francisco. In Ministério do Meio Ambiente: **Diagnóstico do macrozoneamento ecológico-econômico da bacia hidrográfica do Rio São Francisco**, Brasília, Brasil, 36 pp., 2011.

ALVES, P.V; ASSIS, J. C. A.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; PULIDO-MURILLO, E. A., MELO, A. L.; LOCKE, S. A.; PINTO, H. A. A phylogenetic study of the cecal amphistome *Zygoctyle lunata* (Trematoda: Zygoctylidae), with notes on the molecular systematics of Paramphistomoidea, **Parasitology Research**, vol. 119, n. 8, p. 2511-2520, 2020.

ANA/GEF/PNUMA/OEA. **Projeto de Gerenciamento Integrado das Atividades Desenvolvidas em Terra na Bacia do São Francisco: Subprojeto 4.5-C – Plano Decenal de Recurso Hídricos da Bacia do Rio São Francisco – PBHSF (2004-2013), controle de cheias**. Estudo Técnico de Apoio n°10. Brasília: ANA, 2004. 65 p.

ASSIS, J. C. A.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; PULIDO MURILLO, E. A.; MELO, A. L.; PINTO, H. A. A morphological, molecular and life cycle study of the capybara parasite *Hippocrepis hippocrepis* (Trematoda: Notocotylidae). **PLOS ONE**, vol. 14, n. 8, e0221662, 2019.

BAER, J. G. Trématodes de rongerus récoltés em Côte d'Ivoire. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, vol. 37, n. 3, p. 226-254, 1971.

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

BARBOSA, F. S.; PINTO, H. A.; MELO, A. L. *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) como hospedeiro intermediário de *Zygocotyle lunata* (Trematoda: Zygocotylidae) no Brasil. **Neotropical Helminthology**, vol. 5, n. 2, p. 241-246, 2011.

BARBOSA, J. M.; SOARES, E. C. Perfil da ictiofauna da bacia do São Francisco: estudo preliminar. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, vol. 4, n. 1, p. 155-172, 2009.

BARBOSA, J. M.; SOARES, E. C.; CINTRA, I. H. A.; HERMANN, M.; ARAÚJO, A. R. R. Perfil da ictiofauna do rio São Francisco. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, vol. 5, n. 1, p. 70-90, 2017.

BARBOSA, N. P. U.; SILVA, F. A.; OLIVEIRA, M. D.; NETO, M. A. S.; CARVALHO, M. D.; CARDOSO. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae): first record in the São Francisco River, basin, Brazil. **Check List**, vol. 12, n. 1., p. 1-6, 2016.

BARRETTO, A. C.; CASTRO, C. N.; MARSDEN, P. P. Moluscos vectores da esquistossomose masónica no lado leste do rio São Francisco, no estado da Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 14, n. 1, p. 99-102, 1981.

BARTON, D. P.; BLAIR, D. Family Notocotylidae Lühe, 1909. In: JONES, A.; BRAY, R. A.; GIBSON, D. I. **Keys to the Trematoda, Volume 2**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2005b, p. 383-396.

BESPROZVANNYKH, V. V. Life cycle of *Prosthodendrium dollfusi* sp. n. and *Acanthotrium ovatum* (Trematoda: Lecithodendriidae) in the south of the Far East of the USSR. **Parazitologiya**, vol. 24, p. 431-439, 1990 (Em russo).

BESPROZVANNYKH, V. V. Life cycles of trematodes, *Echinochasmus japonicus* Tanabe, 1926 and *E. beleocephalus* (Listow, 1873) (Echinostomatidae) in Prymorye Region. **Parazitologiya**, vol. n. 3, p. 248-258, 2009 (Em russo).

BISEROVA, N. M. Platyhelminthes: Neodermata. *In*: SCHMIDT-RHAESA, A.; HARZSCH, S.; PURSCHKE, G (Eds.). **Structure and Evolution of Invertebrate Nervous Systems**. Oxford: Oxford Univeristy Press, 2016, p. 93-117.

BLAIR, D. Ribosomal DNA variation in parasitic flatworms. *In*: MAULE, A. G.; MARKS, N. J. (Eds.). **Parasitic Flatworms: Molecular, Biology, Biochemistry, Immunology and Control**. Wallingford: CABI Publishing, 2006. p. 96-123.

BLASCO-COSTA, I.; CUTMORE, S. C.; MILLER, T. L.; NOLAN, M. J. Molecular approaches to trematode systematics: 'best practice' and implications for future study. **Systematic Parasitology**, vol. 93, n. 3, p. 295-306, 2016.

BLASCO-COSTA, I.; LOCKE, S. A. Chapter Four – Life history, systematics and evolution of the Diplostomoidea Poirier, 1886: progress, promises and challenges emerging from molecular studies. **Advances in Parasitology**, vol. 98, p. 167-115, 2017.

BLASCO-COSTA, I.; POULIN, R. Parasite life-cycle studies: a plea to resurrect an old parasitological tradition. **Journal of Helminthology**, vol. 91, n. 6, p. 647-656, 2017.

BOWLES J.; HOPE, M.; TIU, W. U.; LIU, X.; MACMANUS, D. P Nuclear and mitochondrial genetic markers highly conserved between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*. **Acta Tropica**, vol. 55, n. 4, p. 217-229, 1993.

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

BRANT, S. V.; MORGAN, J. A.; MKOJI, G. M.; SNYDER, S. D.; RAJAPAKSE, R. P. V. J.; LOKER, E. S. 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**, vol. 92, n. 1, p. 77-88, 2006.

BRASIL, Ministério Do Meio Ambiente. Diretoria do Programa Nacional de Conservação da Biodiversidade – DCBio. **Quarto Relatório Nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2010.

BRASIL-SATO, M. C. Digenea of *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Osteichthyes, Characidae) of the São Francisco River Basin, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, vol. 11, n. 2, 95-98, 2002.

BRASIL-SATO, M. C. Parasitos de peixes a bacia do São Francisco. *In*: GODINHO A. L., GODINHO H. P. (Eds.), **Águas, peixes e Pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: Editora PUC Minas, 2003, cap. 9, p. 149-166.

BRASIL-SATO, M. C.; PAVANELLI, G. C. Digenea de *Pimelodus maculatus* (Osteichthyes, Pimelodidae) das bacias dos rios São Francisco e Paraná, Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, vol. 59, p. 123-131, 2004.

BRASIL-SATO, M. C.; SANTOS, M. D. Helmitos de *Myleus micas* (Lütken, 1875) (Characiformes: Serrasalminae) do rio São Francisco, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, vol. 12, n. 3, p. 131-134, 2003.

BRASIL-SATO, M. C., SANTOS, M. D. Metazoan parasites of *Conorhynchos conirostris* (Valenciennes, 1840), an endemic siluriform fish of the São Francisco Basin, **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, vol. 14, n. 4, p. 160-166, 2005.

BRANT, S. V.; COHEN, A. N.; JAMES, D.; HUI, L.; HOM, A.; LOKER, E. S. Cercarial dermatitis transmitted by exotic marine snail. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 16, n. 9, p. 1357-1365, 2010.

BRANT, S. V.; MORGAN, J. A.; MKOJI, G. M.; SNYDER, S. D.; RAJAPAKSE, R. P.; LOKER, E. S. 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**, vol. 92, n. 1, p. 77-88, 2006.

BRAY, R. A. Family Faustulidae Poche, 1926. *In*: BRAY, R. A.; GIBSON, D. I.; JONES, A. (Eds.), **Keys to the Trematoda, Volume 3**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2008a, p. 511-522.

BRAY, R. A. Superfamily Microphalloidea Ward, 1901. *In*: BRAY, R. A.; GIBSON, D. I.; JONES, A. (Eds.), **Keys to the Trematoda, Volume 3**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2008b, p. 447-450.

BRAY, R. A. Superfamily Opisthorchioidea Looss, 1899. *In*: BRAY, R. A.; GIBSON, D. I.; JONES, A. (Eds.), **Keys to the Trematoda, Volume 3**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2008c, p. 7-8.

BRAY, R. A. Superfamily Plagiorchioidea Lühe, 1901. In: BRAY, R. A.; GIBSON, D. I.; JONES, A (Eds.), **Keys to the Trematoda, Volume 3**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2008d, p. 290-294.

BRAY R. A.; LITTLEWOOD, D.; HERNIOU, E.; WILLIAMS, B.; HENDERSON, R. Digenean parasites of deep-sea teleosts: a review and case studies of intrageneric phylogenies. **Parasitology**, vol. 119, Suppl. 1, p. 125-144, 1999.

BRAY, R. A.; GIBSON, D. I.; JONES, A (Eds.). **Keys to the Trematoda. Volume 3**. Wallingford, UK: CAB International & The Natural History Museum, 2008. 824 p.

BRIOSIO-AGUILAR, R.; PINTO, H. A.; RODRÍGUEZ-SANTIAGO, M. A.; LÓPEZ-GARCÍA, K.; GARCÍA-VARELA, M.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. Link between the adult and the metacercaria of *Clinostomum heluans* (Trematoda: Clinostomidae) through DNA sequences, and its phylogenetic position within the genus *Clinostomum* Leidy, 1856. **Journal of Parasitology**, vol. 103, n. 3, p. 292-296, 2018.

BULLARD, S. A.; JENSEN, K.; OVERSTREET, R. M. Historical account of the two family-group names in use for the single accepted family comprising the “fish blood flukes”. **Acta Parasitologica**, vol. 54, n. 1, p. 78-84, 2009.

BULLARD, S. A.; ROBERTS, J. R.; WARREN, M. B.; DUTTON, H. R.; WHELAN, N. V.; RUIZ, C. F.; PLATT, T. R.; TKACH, V. V.; BRANT, S. V.; HALANYCH, K. M. Neotropical turtle blood flukes: two new genera and species from Amazon river basin with a key to genera and comments on a marine-derived parasite lineage in South America. **Journal of Parasitology**, vol. 105, n. 4, p. 497-523, 2019.

BYERS, J. E.; ALTAM, I.; GROSSE, A. M.; HUSPENI, T. C.; MAERZ, J. C. Using parasitic trematode larvae to quantify an elusive vertebrate host. **Conservation Biology**, vol. 25, n. 1, p. 85-93, 2011.

CAFFARA, M.; LOCKE, S. A.; ECHI, P. C.; HALAJIAN, A.; BENINI, D.; LUUS-POWELL, W. J.; TAVAKOL, S.; FIORAVANTI, M. L. A morphological and molecular study of Clinostomid metacercariae from African fish with a redescription of *Clinostomum tilapiae*. **Parasitology**, vol. 144, n. 11, p. 1519-1529, 2017.

CAMPOS, D. W.; MANOEL, L. O.; FRANCESCHINI, L.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; DELARVA, R. L.; RIBEIRO, C. S.; RAMOS, I. P. Occurrence of metacercariae of *Austrodiplostomum compactum* (Lutz, 1928) (Trematoda, Diplostomidae) in *Pimelodus*

*platicirris* in the Ilha Solteira Reservoir, São Paulo, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 92, suppl. 2, e20180649, 2020.

CBHSF – Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco. **Plano de recursos hídricos da bacia hidrográfica do rio São Francisco 2016-2025**. Alagoas: CBHSF, 2016, 300 p.

CHAI, J. Y. Intestinal flukes. *In*: MURRELL, K. D.; FRIED, B. (Eds.), **Food-borne parasitic zoonose**. World Class Parasites, vol. 11, Springer, Boston, 2007, p. 53-115.

CHAI, J. Y. Echinostomes in humans. *In*: FRIED, B., TOLEDO, R. (Eds.), **The biology of echinostomes: from the molecule to the community**. New York, Springer + Business Media, 2009. cap. 7, p. 147-184.

CHAI, J. Y. Miscellaneous zoonotic species. *In*: CHAI, J., **Human intestinal flukes: From discovery to treatment and control**. Springer, Dordrecht, 2019, p. 491-520.

CHAI, J. Y.; JUNG, B. K. Fishborne zoonotic heterophyid infections: An update. **Food and Waterborne Parasitology**, vol. 8, p. 33-63, 2017.

CHAI, J. Y.; JUNG, B. K. Foodborne intestinal flukes: a brief review of epidemiology and geographical distribution. **Acta Tropica**, vol. 201, 105210, 2020.

CHAI, J. Y.; SOHN, W. M.; YONG, T. S.; EOM, K. S.; MIN, D. Y.; LEE, M. Y.; RIM, H. J. *Centrocestus formosanus* (Heterophyidae): human infections and the infection source in Lao PDR. **Journal of Parasitology**, vol. 99, n. 3, p. 531-536, 2013.

CHALKOWSKI, K.; MORGAN, A.; LEPCZYK, C. A.; ZOHDY, S. Spread of an avian eye fluke, *Philophthalmus gralli*, through biological invasion of an intermediate host. **Journal of Parasitology**, vol. 107, n. 2, p. 336-348, 2021.

CHENG, T.C.; THAKUR, A. S. Thermal activation and inactivation of *Philophthalmus gralli* metacercariae. **Journal of Parasitology**, vol. 53, n. 1, p. 212-213, 1967.

CHOI, M.; KIM, S. H.; CHUNG, J.; JANG, H.; EOM, J.; CHUNG, B.; SOHN, W.; HONG, S. Morphological observations of *Echinochasmus japonicus* cercariae and the in vitro maintenance of its life cycle from cercariae to adults. **Journal of Parasitology**, vol. 92, n. 2, p. 236-241, 2006.

CHONTANANARTH, T.; TEJANGKURA, T.; WETCHASART, N.; CHIMBURUT, C. Morphological characteristics and phylogenetic trends of trematode cercariae in freshwater snails from Nakhon Nayok province, Thailand. **Korean Journal of Parasitology**, vol. 55, n. 1, p. 47-54, 2017.

CHUNG, D. I.; KONG, H. H.; JOO, C. Y. *Radix auricularia coreana*: natural snail host for *Clinostomum complanatum* (Rudolphi). **Korean Journal of Parasitology**, vol. 36, p. 1-6, 1998.

CICCHETO, J. R. M.; STABILE, B. H. M.; FERMINO, F.; FABRIN, T. M. C.; OLIVEIRA, A. V.; TAKEMOTO, R. M.; GRAÇA. Molecular evidence of new freshwater turtle blood flukes (Digenea: Spirorchiidae) in the intermediate snail host *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981 in an urban aquatic ecosystem in Brazil. **Parasitology Research**, vol. 120, p. 133-143, 2021a.

CICCHETO, J. R. M.; STABILE, B. H. M.; FERMINO, F.; FABRIN, T. M. C.; OLIVEIRA, A. V.; TAKEMOTO, R. M.; GRAÇA. The first record of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in Southern Brazil supported by molecular data. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 93, n. 3, 2021b.

CODEVASF - Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba. **Plano Nascente São Francisco**: Plano de preservação e recuperação de nascentes da bacia do rio São Francisco. Brasília: CODEVASF, 2016. 135 p.

COHEN, S. C.; FERNANDES, B. M. M.; GIBSON, D.; BRAY, R. A.; PINTO, H. A.; CAMPIÃO, K. M.; JUSTO, M. Trematoda in **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil**. PNUD. Disponível em: <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/faunadobrasil/79>. Acesso em: 11 nov. 2020.

COMBES, C. **Atlas mondial des cercaires**. Paris: Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, 1980. Zoologie 115, Série A, 235 p.

CORRÊA, R. F. S. S.; BRASIL-SATO, M. C. Digenea in the surubim *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix and Agassiz, 1829) (Siluriformes: Pimelodidae) of the Upper São Francisco River, State of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 51, n. 6, p. 1181-1185, 2008.

CORRÊA, L. L.; SOUZA, G. T.; TAKEMOTO, R. M.; CECCARELLI, P. S.; ADRIANO, E. A. Behavioral changes caused by *Austrodiplostomum* spp., in *Hoplias malabaricus* from the Sao Francisco River, Brazil. **Parasitology Research**, vol. 113, n. 2, p. 499-503, 2014.

COSTA, D. P. C.; MONTEIRO, C. M.; BRASIL-SATO, M. C. Digenea of *Hoplais intermedius* and *Hoplais malabaricus* (Actinopterygii, Erythrinidae) from upper São Francisco River, **Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, vol. 23, n. 2, p. 129-135, 2015.

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

CRIBB, T. H. The biodiversity of trematodes of fishes. **Systematic Parasitology**, vol. 93, n. 3, p. 219-221, 2016.

CRIBB, T. H.; CHICK, R. C.; O'CONNOR, W.; O'CONNOR, S.; JOHNSON, D.; SEWELL, K. B.; CUTMORE, S. C. Evidence that blood flukes (Trematoda: Aporocotylidae) of chondrichthyans infect bivalves as intermediate hosts: indications of an ancient diversification of the Schistosomatoidea. **International Journal for Parasitology**, vol. 47, n. 13, p. 885-891, 2017.

DA SILVA, P. M.; CREMONTE, F.; SABRY, R. C.; ROSA, R. D.; CANTELLI, L.; BARRACCO, M. A. Presence and histopathological effects of the *Parvatrema* sp. (Digenea, Gymnophallidae) in the stout razor clam *Tagelus plebeius* (Bivalvia, Psammobiidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, vol. 102, n. 1, p. 14-20, 2009.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, vol. 85, n. 3, p. 407-415, 2005.

DAWES, B (Ed.). **The Trematoda, with special reference to British and European forms**. London: Cambridge University Press, 1946 reprinted in 1968, 664 p.

DELLAGNOLA, F. A.; MONTES, M. M.; MARTORELLI, S. R.; VEGA, I. A. Morphological characterization and molecular phylogeny of zoonotic trematodes in the freshwater snail *Asolene plataea*. **Parasitology**, vol. 146, n. 7, p. 839-848, 2019.

DESLANDES, N. Técnica de dissecação e exame de planorbídeos. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, vol. 4, p. 371-382, 1951.

DHANUMKUMARI, CH.; RAO, K. H.; SHYAMASUNDARI, K. The life cycle of *Echinochasmus bagulai* (Trematoda: Echinostomatidae). **International Journal for Parasitology**, vol. 21, n. 2, p. 259-263, 1991.



DIAS, K. G. A.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; CAMARGO, A. A.; MÜLLER, M. I.; SILVA, R. J., AZEVEDO, R. K.; ABDALLAH, V. D. A new species of *Wallinia* Pearse, 1920 (Digenea: Allocreadiidae) collected from *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) and *A. lacustris* Lucena and Soares, 2016 (Characiformes: Characidae) in Brazil based on morphology and DNA sequences. **Parasitology Research**, vol. 117, n. 9, p. 2847-2854, 2018.

DIAS, K. G. A.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; CAMARGO, A. A.; MÜLLER, M. I.; SILVA, R. J., AZEVEDO, R. K.; ABDALLAH, V. D. A new species of *Creptotrematina* (Trematoda: Allocreadiidae) from characid fishes of Brazil: morphological and molecular data. **Journal of Helminthology**, vol. 94, p. 1-9, e163, 2020.

DÍAZ, M. T.; HERNÁNDEZ, L. E.; BASHIRULLAH, A. K. Experimental life cycle of *Philophthalmus gralli* (Trematoda: Philophthalmidae) in Venezuela. **Revista de Biología Tropical**, vol. 50, n. 2, p. 629-641, 2002.

DRAGO, F. B.; LUNASCHI, L.I. Description of a new species of *Tylodelphys* (Digenea, Diplostomidae) in the wood stork, *Mycteria Americana* (Ave, Ciconiidae) from Argentina. **Acta Parasitologica**, vol. 53, n. 3, p. 263-267, 2008.

DRAGO, F. B.; LUNASCHI, L. I. A new species of *Parastrigea* (Digenea: Strigeidae) endoparasite of *Buteogallus urubitinga* (Aves: Accipitridae) from Argentina. **Helminthologia**, vol. 48, n. 4, p. 256-261, 2011.

DRAGO, F. B.; LUNASCHI, L. I.; SCHENONE, M. Digenean parasites of the Neotropic cormorant, *Phalacrocorax, brasiliensis* (Gmelin, 1789) (Aves: Phalacrocoracidae) from Argentina: distribution, extension and new host records. **Check List**, vol. 7, n. 6, p. 871-875, 2011.

DRAGO, F. B.; NÚÑEZ, V.; LUNASCHI, L. I. Strigeid parasites of *Circus buffoni* from Argentina, with the description of a new species of *Parastrigea* Szidat, 1928. **Parasitology Research**, vol. 117, n. 3, p. 751-758, 2019.

DRONEN, N. O.; FRIED, B. Comparative study of the age classes of two species of *Philophthalmus* Looss, 1899 (Philophthalmidae: Philophthalminae). **Comparative Parasitology**, vol. 75, n. 1, p. 12-23, 2008.

DUAN, Y.; AL-JUBURY, A.; KANIA, P. W.; BUCHMANN, K. Trematode diversity reflecting the community structure of Danish freshwater systems: molecular clues. **Parasites & Vectors**, vol. 14, n. 1; p. 1-15, 2021.

DUTTON, H. R.; WARREN, M. B.; BULLARD, S. A. New genus and species of turtle blood fluke (Platyhelminthes: Digenea: Schistosomatoidea) infecting six-tubercled Amazon river turtles, *Podocnemis sextuberculata* (Pleurodira: Podocnemidae) from the Amazon River Basin. **Journal of Parasitology**, vol. 105, n. 5, p. 671-685, 2019.

EVANS, W. A.; HECKMANN, R. A. The life history of *Sanguinicola klamathensis*. **Life Sciences**, vol. 13, n. 9, p. 1285-1291, 1973.

FALTÝNKOVÁ, A.; NAŠINCOVÁ, V.; KABLÁSKOVÁ, L. Larval trematodes (Digenea) of planorbid snails (Gastropoda: Pulmonata) in Central Europe: a survey of species and keys to their identification. **Systematic Parasitology**, vol. 69, p. 155-178, 2008.

FALTÝNKOVÁ, A.; SURES, B.; KOSTADINOVA, A. Biodiversity of trematodes in their intermediate mollusc and fish hosts in the freshwater ecosystems of Europe. **Systematic Parasitology**, vol. 93, n. 3, p. 283-293, 2016.

FELSENSTEN, J.P. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, vol. 39, n. 4, p. 261-270, 1985.

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

FERNANDES, B. M. M.; COHEN, S. C.; MENDONÇA, H. S.; JUSTO, M. C. N. *Annakohniella travassosi* n. gen., n. sp. (Digenea: Cryptogonimidae) parasite of *Rhaphiodon vulpinus* (Pisces: Cynodontidae) from Brazil. **Comparative Parasitology**, vol. 80, n. 1, p. 17-21, 2013.

FERNANDES, B. M. M.; KOHN, A. **South American trematodes parasites of amphibians and reptiles**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz – Oficina de Livros, 2014, 226p.

FERNANDES, B. M. M.; JUSTO, M. C. N.; CÁRDENAS, M. Q.; COHEN, S. C. **South American trematodes parasites of mammals and birds**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz – Oficina de Livros, 2015, 516p.

FERNANDES, T. F.; SANTOS, J. N.; MELO, F. T.; ACHATZ, T. J.; GREIMAN, S. E.; BONILLA, C. C.; TKACH, V. V. Interrelationships of *Anenterotrema* (Digenea: Dicrocoeliidae) from Neotropical bats (Mammalia: Chiroptera) with description of a new

species from *Molossus molossus* in Brazil **Parasitology Research**, vol. 120, n. 6, p. 2003-2016, 2021.

FERNÁNDEZ, M. V.; HAMANN, M. I.; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M. Echinostome cercariae from *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) in a ricefield from northeastern Argentina. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, vol. 85, n. 4, p. 1024-1031, 2014.

FERNÁNDEZ, M. V.; HAMANN, M. I. Cercariae (Digenea: Strigeidae, Diplostomidae) in *Biomphalaria straminea* (Planorbidae) from a rice field in Northeastern Argentina. **Revista de Biología Tropical**, vol. 65, n. 2, p. 551-563, 2017.

FIGUEIRA, G. F.; OLIVEIRA, V. H. S.; TARODA, A.; ALFIERI, A. A.; HEADLEY, S. A. Molecular characterization of *Eurytrema coelomaticum* in cattle from Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 3, p. 383-386, 2014.

FLORES, V.; BRUGNI, N. *Notocotylus biomphalariae* n. sp. (Digenea: Notocotylidae) from *Biomphalaria peregrina* (Gastropoda: Pulmonata) in Patagonia, Argentina. **Systematic Parasitology**, vol. 61, n. 3; p. 207-214, 2005.

EBERT, M. B.; VALENTE, A. L. S.; CREMER, M. J.; SILVA, R. J. *Pholeter gastrophilus* (Trematoda: Heterophyidae), a parasite of dolphins from Brazilian waters. **Biologia**, vol. 76, p. 3411-3420, 2021.

FOLMER, O. *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, vol. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.

FRANCESCHINI, L.; AGUIAR, A.; ZAGO, A. C.; YAMADA, P. O. F.; EBERT, SILVA, R. J. Three new species of *Creptotrema* (Trematoda, Allocreadiidae) with an amended diagnosis of the genus and reassignment of *Auriculostoma* (Allocreadiidae), based on morphological and molecular evidence. **Parasite**, vol. 28, 69, 2021.

FRANDSEN, F.; CHRISTENSEN, N. O. An introductory guide to identification of cercariae from African freshwater snails with special reference to cercariae of trematode species of medical and veterinary importance. **Acta Tropica**, vol. 41, n. 2, p. 181-202, 1984.

FREITAS, J. F. T. Sobre dois trematódeos parasitos de aves: *Philophthalmus lachrymosus* Braun, 1902 e *Renicola mirandaribeiroi* n. sp. **Arquivos do Museu Nacional**, vol. 42, p. 585-610, 1955.

FRIED, B.; HUFFMAN, J. E.; KEELER, S.; PEOPLES, R. C. The biology of the caecal trematode *Zygocotyle lunata*. **Advances in Parasitology**, vol. 69, p. 1-40, 2009.

GAGNON, D. K.; DETWILER, J. T. Broader geographic sampling increases extent of intermediate host specificity for a trematode parasite (Notocotylidae: *Quinqueserialis quinqueserialis*). **Journal of Parasitology**, vol. 105, n. 6, p. 874-877, 2019.

GAGNON, D. K.; KASL, E. A.; PREISSER, W. C.; BELDEN, L. K.; DETWILER, J. T. Morphological and molecular characterization of *Quinqueserialis* (Digenea: Notocotylidae) species diversity in North America. **Parasitology**, vol. 148, n. 9, p. 1083-1091, 2021.

GALAKTIONOV, K. V.; DOBROVOLSKIJ, A. A. The trematode life cycle as a system of adaptations. *In*: GALAKTIONOV, K.; DOBROVOLSKIJ, A. A. (Eds.), **The biology and evolution of trematodes: an essay on the biology, morphology, life cycles, transmissions, and evolution of digenetic trematodes**. Dordrecht, Springer Science + Business Media, 2003. cap. 2, p. 215-318.

GALAKTIONOV, K. V.; BLASCO-COSTA, I. *Microphallus ochotensis* sp. nov. (Digenea, Microphallidae) and relative merits of two-host microphallid life cycles. **Parasitology Research**, vol. 118, n. 4, p. 1051-1068, 2018.

GALAZZO, D. E. Molecular systematics of some North American species of *Diplostomum* (Digenea) based on rDNA-sequence data and comparisons with European congeners. **Canadian Journal of Zoology**, vol. 80, n. 12, p. 2207-2217, 2002.

GARCÍA-VARELA, M.; SERENO-URIBE, A. L.; PINACHO-PINACHO, C. D.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. Molecular and morphological characterization of *Austrodiplostomum ostrowskiae* Dronen, 2009 (Digenea: Diplostomidae), a parasite of cormorants in the Americas. **Journal of Helminthology**, vol. 90, n. 2, p. 174-185, 2016.

GEORGIEVA, S.; FALTÝNKOVÁ, A.; BROWN, R.; BLASCO-COSTA, I.; SOLDÁNOVÁ, M.; SITKO, J.; SCHOLZ, T.; KOSTADINOVA, A. *Echinostoma 'revolutum'* (Digenea: Echinostomatidae) species complex revisited: species delimitation based on novel molecular and morphological data gathered in Europe. **Parasite & Vectors**, vol. 7, n. 1, p. 1-18, 2014.

GIBSON, D. I.; JONES, A.; BRAY, R. A. **Keys to the Trematoda. Volume I**. Wallingford, UK: CAB International & The Natural History Museum, 2002, 521 p.

GILARDONI, C.; POSADAS, G.; KROECK, M.; CREMONTE, F. Monorchiid and aporocotylid cercariae (Digenea) parasitising the purple clam *Amiantis purpurata* (Bivalvia, Veneridae) from the Southwestern Atlantic coast. **Acta Parasitologica**, vol. 56, n. 4, p. 385-391, 2011.

GOMES, T. F. F. *et al.* A new species of *Mesocoelium* (Digenea: Mesocoeliidae) found in *Rhinella marina* (Amphibia: Bufonidae) from Brazilian Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 108, n. 2, p. 186-191, 2013.

GOMES, T. F. F.; MELO, F. T. V.; GIESE, E. G.; FURTADO, A. P.; SANTOS, J. N. *Choledocystus elegans* (Digenea: Plagiorchiidae) of *Leptodactylus paraensis* (Amphibia: Leptodactylidae) from the Brazilian Amazon. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, vol. 26, n. 4, p. 511-515, 2017.

GORDY, M. A.; KISH, L.; TARRABAIN, M.; HANINGTON, P. C. A comprehensive survey of larval digenean trematodes and their snail hosts in central Alberta, Canada. **Parasitology Research**, vol. 115, n. 10, p. 3867-3880, 2016.

GORDY, M. A.; HANINGTON, P. C. A fine-scale phylogenetic assessment of digenean trematodes in central Alberta reveals we have yet to uncover their total diversity. **Ecology and Evolution**, vol. 9, n. 6, p. 3153-3238, 2019.

HAMANN, M. I.; LEÓN-RÉGAGNON, V.; FERNÁNDEZ, M. V.; GONZÁLEZ, C. E. First record of the genus *Choledocystus* (Trematoda: Plagiorchiidae) for amphibians of the Chacoan región in Argentina. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 92, n. 1, e20180384, 2020.

HARA, H.; MIYAUCHI, Y.; TAHARA, S.; YAMASHITA, H. Human laringitis caused by *Clinostomum complanatum*. **Nagoya Journal of Medical Science**, vol. 76, n. 1-2, p. 181-185, 2014.

HENEBERG, P.; SITKO, J.; Těššínský, M.; RZAÐ, I.; BIZOS, J. Central European Strigeidae Railliet, 1919 (Trematoda: Strigeidida): Molecular and comparative morphological analysis suggests the reclassification of *Parastrigea robusta* Szidat, 1928 into *Strigea* Abildgaard, 1790. **Parasitology International**, vol. 67, n. 6, p. 688-701, 2018.

HERBER, E. C. Life history on two trematodes of the subfamily Notocotylinae. **Journal of Parasitology**, vol. 28, n. 3, p. 179-196, 1942.

HERNÁNDEZ-CRUZ, E.; HERNÁNDEZ-ORTS, J. S.; SERENO-URIBE, A. L.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; GARCÍA-VARELA, M. 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**, vol. 92, n. 5, p. 572-595, 2018.

HERNÁNDEZ-CRUZ, E. *et al.* 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**, vol. 92, n. 5, p. 572-595, 2018.

HERNÁNDEZ-MENA, D. I.; GARCÍA-PRIETO, L.; GARCÍA-VARELA, M. Morphological and molecular differentiation of *Parastrigea* (Trematoda: Strigeidae) from Mexico, with the description of a new species. **Parasitology International**, vol. 63, n. 2, p. 315-323, 2014.

HUDSON, P. T.; DOBSON, A. P.; LAFFERTY, K. D. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? **Trends in Ecology & Evolution**, vol. 21, n. 7, p. 381-385, 2006.

HUFFMAN, J. E.; FRIED, B. Trematodes from *Goniobasis virginica* (Gastropoda: Pleuroceridae) in lake Musconetcong, New Jersey. **Journal of Parasitology**, vol. 69, n. 2, p. 429, 1983.

HUGGHINS, E. J. Life history of a strigeid trematode, *Hysteromorpha triloba* (Rudolphi, 1819) Lutz, 1931. II. Sporocyst through adult. **Transactions of the American Microscopical Society**, vol. 73, n. 3, p. 221-236, 1954.

HSU, K. C.; LIE, K. J.; BASCH, P. F. The life history of *Echinostoma rodriguesi* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). **Journal of Parasitology**, vol. 54, n. 2, p. 333-339, 1968.

IZRAILSKAIA, A. V.; BESPROZVANNYKH, V. V.; TATONOVA, Y. V.; NGUYEN, H. M.; NGO, H. D. Developmental stages of *Notocotylus magniovatus* Yamaguti, 1934, *Catatropis vietnamensis* n. sp., *Pseudocatatropis dvoryadkini* n. sp., and phylogenetic relationships of Notocotylidae Lühe, 1909. **Genetics, Evolution, and Phylogeny**, vol. 118, p. 469-481, 2019.

JONES, A. Family Zygoctylidae Ward, 1917. In: JONES, A.; BRAY, R. A.; GIBSON, D. I. (Eds.), **Keys to the Trematoda, Volume 2**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2005, p. 353-356.

JONES, A.; BRAY, R. A.; GIBSON, D. I. **Keys to the Trematoda. Volume 2.** Wallingford, UK: CAB International & The Natural History Museum, 2005. 745 p.

JOHNSON, P. T. J.; SUTHERLAND, D. R.; KINSELLA, J. M.; LUNDE, K. B. R. Review of the trematode genus *Ribeiroia* (Psilostomidae): ecology, life history and pathogenesis with special emphasis on the amphibian malformation problem. **Advances in Parasitology**, vol. 57, n. 191-253, 2004.

JOHNSON, P. T. J.; LUNDE, K. B.; HAIGHT, R. W.; BOWERMAN, J.; BLAUSTEIN, A. R. *Ribeiroia ondatrae* (Trematoda: Digenea) infection induces severe limb malformations in western toads (*Bufo boreas*). **Canadian Journal of Zoology**, vol. 79, n. 3, p. 370-379, 2001.

KANEV, I.; RADEV, V.; FRIED, B. Family Philophthalmidae Looss, 1899. In: JONES, A.; BRAY, R. A.; GIBSON, D. I. (Eds.), **Keys to the Trematoda, Volume 2.** London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2005, p. 87-97.

KANEV, I.; FRIED, B.; RADEV, V. Collar spine models in the genus *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, vol. 105, n. 4, p. 921-927, 2009.

KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelminthoses.** Belo Horizonte, CPqRR, 2018.

KHALIL, F. G. Family Schistosomatidae Stiles & Hassal, 1898. In: GIBSON, D. I.; JONES, A.; BRAY, R. A. **Keys to the Trematoda, Volume 1.** London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2002, p. 419-432.

KING, P. H.; VAN AS, J. G. Description of the adult and larval stages of *Tylodelphys xenopi* (Trematoda: Diplostomidae) from Southern Africa. **Journal of Parasitology**, vol. 83, n. 2, p. 287-295, 1997.

KIRK, R. S.; LEWIS, J. W. The life-cycle and morphology of *Sanguinicola inermis* Plehn, 1905 (Digenea: Sanguinicolidae). **Systematic Parasitology**, vol. 25, p. 125-133, 1993.

KMENTOVÁ, N.; BRAY, R. A.; KOBLMÜLLER, S.; ARTOIS, T.; DE KEYZER, E. L. R.; GELNAR, M.; VANHOVE, M. P. M.; GEORGIEVA, S. Uncharted digenean diversity in Lake Tanganyika: cryptogonimids (Digenea: Cryptogonimidae) infecting endemic lates perches (Actinopterygii: Latidae). **Parasites & Vectors**, vol. 13, n. 1, p. 1-24, 2020.

KOGA, Y. Studies on the life history of the trematodes belonging to the family Echinostomatidae. II On the life history of a new trematode belonging to the genus *Microparyphium*. **Kurume Igakkai Zasshi**, vol. 15, p. 28-40, 1952.

KOHN, A.; FERNANDES, B. M. M.; BAPTISTA-FARIAS, M. F. Redescription of *Prothenhystera obesa* (Diesing, 1850) (Callodistomidae, Digenea) with new host records and data on morphological variability. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 92, n. 2, p. 171-179, 1997.

KOHN, A.; FERNANDES, B. M. M.; COHEN, S. C. **South American trematodes parasites of fishes**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz – Oficina de Livros, 2007, 318p.

KOLÁŘOVÁ, L.; HORÁK, P.; SKÍNISSON, K.; MAREČKOVÁ, H.; DOENHOFF, M. Cercarial dermatitis, a neglected allergic disease. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, vol. 45, n. 1, p. 63-74, 2013.

KÖPPEN, W. Versuch einer Klassifikation der Klimate, verzugsweise nach ihren Beziehungen zur Pflanzenwelt. **Geographische Zeitschrift**, vol. 6, p. 593-611, 1900.

KOSTADINOVA, A. Family Echinostomatidae Looss, 1899. *In*: JONES, A.; BRAY, R. A.; GIBSON, D. I. (Eds.), **Keys to the Trematoda, Volume 2**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2005a, p. 9-64.

KOSTADINOVA, A. Family Psilotomatidae Looss, 1900. *In*: JONES, A.; BRAY, R. A.; GIBSON, D. I. (Eds.), **Keys to the Trematoda, Volume 2**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2005b, p. 99-118.

KOSTADINOVA, A.; GIBSON, D. A redescription of *Uroproctepisthmium bursicola* (Creplin, 1837) n. comb. (Digenea: Echinostomatidae), and re-evaluations of the genera *Episthmium* Lühe, 1909 and *Uroproctepisthmium* Fischthal & Kuntz, 1976. **Systematic Parasitology**, vol. 50, n. 1, p. 63-67, 2001.

KOSTADINOVA, A.; PÉREZ DEL OLMO, A. Chapter 2: The systematics of the Trematoda. *In*: TOLEDO, R.; FRIED, B. (Eds.), **Digenetic trematodes (Advances in experimental medicine and biology)**. New York, Springer, 2014, 21-44.

KRESS, W. J.; GARCÍA-ROBLEDO, URIARTE, M.; ERICKSON, D. L. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, vol. 30, n. 1, p. 25-35, 2015.



KRULL, W. H. Some observations on the cercária and redia of a species of *Clinostomum*, apparently *C. marginatum* (Rudolphi, 1819) (Trematoda: Clinostomidae). **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, vol. 1, p. 34-35, 1934.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA K. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, vol. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LACERDA, A. C. F.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. Digenea, Nematoda, Cestoda, and Acanthocephala, parasites in Potamotrygonidae (Chondrichthyes) from the upper Paraná River floodplain, states of Paraná and Mato Grosso do Sul, Brazil. **Check List**, vol. 4, n. 2, p. 115-122, 2008.

LACERDA, L. E. M.; RICHAU, C. S.; AMARAL, C. R.; SILVA, D. A.; CARVALHO, E. F.; SANTOS, S. B. *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863): a freshwater snail cryptic invader in Brazil revealed by morphological and molecular data. **Aquatic Invasions**, vol. 10, n. 2, p. 157-168, 2015.

LAIDEMITT, M. R.; BRANT, S. V.; MUTUKU, M. W.; MKOJI, G. M. LOKER, E. S. The diverse echinostomes from East Africa: with a focus on species that use *Biomphalaria* and *Bulinus* as intermediate hosts. **Acta Tropica**, vol. 193, p. 38-49, 2019.

LAMOTHE-ARGUMEDO, R.; DÍAZ-CAMACHO, S. P.; NAWA, Y. The first human case in Mexico of conjunctivitis caused by the avian parasite, *Philophthalmus lacrimosus*. **Journal of Parasitology**, vol. 89, n. 1, p. 183-185, 2003.

LEITE, A. C. R.; COSTA, H. M. A.; COSTA, J. O. *Trichobilharzia jequitibaensis* sp. n. (Trematoda: Schistosomatidae) in *Cairina moschata domestica* (Anatidae). **Brazilian Journal of Biology**, vol. 38, p. 843-846, 1978.

LEITE, A. C. R.; COSTA, H. M. A.; COSTA, J. O.; GUIMARÃES, M. P.; LIMA, W. S. The life cycle of *Dendritobilharzia anatinarum* Cheatum, 1941 (Trematoda, Schistosomatidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 77, n. 4, p. 389-396, 1982.

LIE, K. J.; BASCH, P. F. Life history of *Echinostoma barbosai* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). **Journal of Parasitology**, vol. 52, n. 6, p. 1052-1057, 1966.

LIE, K. J.; BASCH, P. F. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). **Journal of Parasitology**, vol. 53, n. 6, p. 1192-1199, 1967.

LIMA E COSTA, M. F. *et al.* Avaliação do programa de controle da esquistossomose (PCE/PCDDEN) em municípios situados na bacia do rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 29, n. 2, p. 117-126, 1996.

LIMA, L. F. O.; BRASIL, B. I. A. L.; MARTINS-SILVA, M. J. *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774): northeastern dispersal in the São Francisco basin, Brazil. **Check List**, vol. 9, n. 1, p. 162-164, 2013.

LITTLEWOOD, D. T. J. Platyhelminth systematics and the emergence of new characters. **Parasite**, vol. 15, n. 3, p. 333-341, 2008.

LOCKE, S. A.; DAM, A. V.; CAFFARA, M.; PINTO, H. A.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; BLANAR, C. A. Validity of the Diplostomoidea and Diplostomida (Digenea, Platyhelminthes) upheld in phylogenomic analysis. **International Journal for Parasitology**, vol., 48, n. 13, p. 1043-1059, 2018.

LOCKE, S. A.; DRAGO, F. B.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; CHIBWANA, F. D.; NÚÑEZ, V.; DAM, A. V.; ACHINELLY, M. F.; JOHNSON, P. T. J.; ASSIS, J. C. A.; MELO, A. L.; PINTO, H. A. Intercontinental distributions, phylogenetic position and life cycles of species of *Apharyngostrigea* (Digenea, Diplostomoidea) illuminated with morphological, experimental and genomic data. **International Journal for Parasitology**, vol. 51, n. 8, p. 667-683, 2021.

LOPES, A. S.; PULIDO-MURILLO, E. A.; MELO, A. L.; PINTO, H. A. *Haplorchis pumilio* (Trematoda: Heterophyidae) as a new fish-borne zoonotic agent transmitted by *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) in Brazil: A morphological and molecular study. **Infection, Genetics and Evolution**, vol. 85, 104495, 2020.

LOPES, A. S.; PULIDO-MURILLO, E. A.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; MELO, A. L.; PINTO, H. A. First report of *Melanoides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) harborind a xiphidiocercaria in Brazil: A new parasite introduced in the Americas? **Parasitology International**, vol. 82, 102284, 2021.

LÓPEZ-JIMÉNEZ, A.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. T.; GARCÍA-VARELA, M. Molecular and morphological evidence suggests the reallocation from *Parastrigea brasiliiana* (Szidat, 1928) Dubois, 1964 to *Apharyngostrigea* Ciurea, 1927 (Digenea: Strigeidae), a parasite of boat-billed heron (*Cochlearius cochlearius*) from the Neotropical region. **Parasitology International**, vol. 86, 102468, 2022.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; LOCKE, S. A.; MELO, A. L.; RABELO, E. M. L.; PINTO, H. A. 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**, vol. 63, p. 95-103, 2018.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; LOCKE, S. A.; ASSIS, J. C. A.; DRAGO, F. B.; MELO, A.; RABELO, E. M. L.; PINTO, H. A. 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**, vol. 199, 105082, 2019.

LOMBARDI, J. A.; SALINO, A.; TEMONI, L. G. Diversidade florística de plantas vasculares no Município de Januária, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, vol. 6, n. 1, p. 3-20, 2005.

LOTZ, J. M.; FONT, W. F. Family Lecithodendriidae Lühe, 1901. In: BRAY, R. A.; GIBSON, D. I.; JONES, A. (Eds.), **Keys to the Trematoda, Volume 3**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2008a, p. 527-543.

LOTZ, J. M.; FONT, W. F. Family Phanerosolidae Mehra, 1935. In: BRAY, R. A.; GIBSON, D. I.; JONES, A. (Eds.), **Keys to the Trematoda, Volume 3**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2008b, p. 545-562.

LUNASCHI, L. I.; DRAGO, F. B. Descripción de una especie nueva de *Tylodelphys* (Digenea: Diplostomidae) parásita de *Podiceps major* (Aves: Podicipedidae) de Argentina. **Anales del Instituto de Biología – Serie Zoología**, vol. 75, n. 2, p. 245-252, 2004.

LUTON, K.; WALKER, D.; BLAIR, D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 55, n. 2, 323-328, 1992.

LUTZ, A O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose, segundo observações feitas no Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 11, n. 1, p. 121-155, 1919.

LUTZ, A. Estudos sobre a evolução dos Endotrematodes brasileiros. Parte Especial. I. Echinostomatidae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 17, n. 1, p. 75-93, 1924.

LUTZ, A. Outro grupo de trematodes nascendo de Dicranocercarias e outro caso de espécie com cecos abrindo para fóra. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 29, n. 2, p. 229-248, 1934.

MADHAVI, R.; BRAY, R. A. The Digenetic Trematodes. *In*: MADHAVI, R.; BRAY, R. A. (Eds), **Digenetic Trematodes of Indian marine fishes**. Springer, 2018, p. 9-21.

MALDONADO JR, A.; VIEIRA, G. O.; LANFREDI, R. M. *Echinostoma luisreyi* n. sp. (Platyhelminthes: Digenea) by light and scanning electron microscopy). **Journal of Parasitology**, vol. 89, n. 4, p. 800-808, 2003.

MARCOGLIESE, D. J. Parasites: small players with crucial roles in the ecological theater. **EcoHealth**, vol. 1, p. 151-164, 2004.

MARCOGLIESE, D. J. Parasites of the superorganism: Are they indicators of ecosystem health? **International Journal for Parasitology**, vol. 35, p. 705-716, 2005.

MARTIN, G. W. Description and life cycle of *Glypthelmins hyloreus* sp. n. (Digenea: Plagiorchiidae). **Journal of Parasitology**, vol. 55, n. 4, p. 747-752, 1969.

MARTINS, A. N.; SABAS, C. D. S.; SANTOS, M. D. C. B. *Prothenhystera obesa* (Diesing, 1850) (Digenea, Callodistomidae) in the São Francisco River basin, Brazil: new records and their ecological parameters. **Neotropical Helminthology**, vol. 6, n. 1, p. 31-41, 2012.

MARTINS, I. V. F.; FAILLA, G.; MARTINS, M. S. S.; UZAI, G. J.; VIANA, M. V. G.; GOMES, M. C.; VEROCAI, G. G. Molecular confirmation of *Fasciola hepatica* infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrocaeris*) from the state of Espírito Santo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, vol. 30, n. 2, e000221, 2021.

MATOS, A. M. R. N.; LAVORENTE, F. L. P.; LORENZETTI, E.; MEIA FILHO, M. R. C.; NÓBREGA, D. F.; CHRYSSEFIDIS, A. L.; OLIVEIRA, A. G.; DOMIT, C.; BRACARENSE, A. P. R. L. Molecular identification and histological aspects of *Renicola sloanei* (Digenea: Rencolidae) in *Puffinus puffinus* (Procellariiformes): a first record. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, vol. 28, n. 3, p. 367-375, 2019.

MELO, F. L.; GOMES, A. L. V.; BARBOSA, C. S.; WERKHAUSER, R. P.; ABATH, F. G. C. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 100, p. 1049-1055, 2006.

MESQUITA, R. L. B.; AZEVEDO, R. K.; ABDALLAH, V. D.; LUQUE, J. L. Ectoparasites as numerical dominant species in parasite community of *Thachelyopterus striatulus* (Siluriformes: Auchenipteridae) from Guandu River, southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 71, n. 3, p. 623-627, 2011.

MCMILLAN, T. A. **Life history of *Philophthalmus megalurus* (Cort, 1914) in western Oregon**. Dissertation (Master of Science in Biology) – Portland State University, Department of Biology, Portland, 1971.

MEADE, T. G. Life history studies on *Cardicola klamathensis* (Wales, 1958) Meade and Pratt, 1965 (Trematoda: Sanguinicolidae). **Proceeding of the Helminthological Society of Washington**, vol. 34, n. 2, p. 210-212, 1967.

MELO, I. F. L. **Levantamento da malacologia límnic e helmintofauna associada aos moluscos dulcícolas do município de Nossa Senhora de Lourdes**. 2018. 90 p. Dissertação (mestrado em Biologia Parasitária) – Sergipe. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2018.

MELO, F.; T. V.; SILVA, J. P.; GONÇALVES, E. C.; FURTADO, A. P.; GIESE, E. G.; SANTOS, C. P.; SANTOS, J. N. Taxonomic status and redescription of the genus *Brasicystis* Thatcher, 1979 (Digenea: Didymozoidae). **Parasitology International**, vol. 62, n. 2, p. 208-214, 2013.

MILLER, T. L.; CRIBB, T. H. Family Cryptogonimidae (Ward, 1917) Ciurea, 1933. *In*: BRAY, R. A.; GIBSON, D. I.; JONES, A. (Eds), **Keys to the Trematoda, Volume 3**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2008, p. 50-112.

MITCHELL, J. A. *Centrocestus formosanus* in cultured and wild fishes: Impact on fish, distribution in the United States and host information. **American Fishery Society (Fish Health Section) Proceeding**, p. 23, 2005.

MIURA, O.; KURIS, A. M.; TORCHIN, M. E.; HECHINGER, R. F.; DUNHAM, E. J.; CHIVA, S. Molecular-genetic analyses reveal cryptic species of trematodes in the intertidal gastropod, *Batillaria cumingi* (Crosse). **International Journal for Parasitology**, vol. 35, n. 7, p. 793-801, 2005.

MORGAN, J. A. T.; DEJONG, R. J.; SNYDER, S. D.; MKOJI G. M.; LOKER, E. S. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. **Parasitology**, vol. 123, n. 7, p. 211-228, 2001.

MONTEIRO, C. M.; AMATO, J. F.; AMATO, S. B. Helminth parasitismo in the Neotropical cormorant, *Phalacrocorax brasilianus*, in Southern Brazil: Effect of host size, weight, sex, and maturity state. **Parasitology Research**, vol. 109, n. 3, p. 849-855, 2011.

MONTEIRO, C. M.; MARTINS, A. N.; ALBURQUEQUE, M. C.; SANTOS, CLAPP, M. D.; DUARTE, R.; SÃO SABAS, C. D. S.; SATO, M. D. C. B. *Austrodiplostomum compactum* Szidat & Nani (Digenea: Diplostomidae) in final a second intermediate hosts from upper São Francisco river in the State of Minas Gerais. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, vol. 38, suppl.3, p. 146-150, 2016.

MOSZCZYNSKA, A.; LOCKE, S. A.; MCLAUGHLIN, J. D.; MARCOGLIESE, D. J.; CREASE, T. J. Development of primers for the mitochondrial cytochrome *c* oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. **Molecular Ecology Resources**, vol. 9, suppl. 1, p. 74-82, 2009.

MORGAN, J. A. T.; BLAIR, D. Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group. **Parasitology**, vol. 111, n. 5, p. 609-615, 1995.

MORGAN, J. A. T.; BLAIR, D. Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacers and mitochondrial CO1 and ND1 genes for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda). **Parasitology**, vol. 116, n. 3, p. 289-297, 1998.

MORLEY, N. J. Cercariae (Platyhelminthes: Trematoda) as neglected components of zooplankton communities in freshwater habitats. **Hydrobiologia**, vol. 691, n. 1, p. 7-19, 2012.

MOSZCZYNSKA, A.; LOCKE, S. A.; MCLAUGHLIN, J. D.; MARCOGLIESE, D. J.; CREASE, T. J. Development of primers for the mitochondrial cytochrome *c* oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. **Molecular Ecology Resources**, vol. 9, suppl. 1, p. 74-82, 2009.

MÜLLER, M. I.; EMMERICH, E.; ALCANTARA, E. P.; UNGARI, L. T.; EBERT, M. B.; MORAIS, D. H.; O'DWYER, L. H.; SILVA, R. J. First molecular assessment of two digenean parasites of the lancehead snake *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Serpentes, Viperidae) in Brazil. **Parasitology Research**, vol. 120, p. 971-977, 2021.

MUNIZ-PEREIRA, L. C.; AMATO, S. B. *Philophthalmus gralli* (Digenea: Philophthalmidae) parasite of *Ana bahamensis* and *Amazonetta brasiliensis*, from lagoons of Maricá county, Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 88, n. 4., p. 567-569, 1993.

NAJIM, A. T. Life history of *Gigantobilharzia huronensis* Najim, 1950. A dermatitis-producing bird blood-fluke (Trematoda-Schistosomatidae). **Parasitology**, vol. 46, n. 3-4, p. 443-469, 1956.

NAMCHOTE, S.; SRITONGTAE, S.; BUTNIN, S.; WONGWAIN, P.; KRAILAS, D. Larval stage of trematodes obtained from brackish water snails in the central and east coast of the gulf of Thailand. **Scientific Research and Essays**, vol. 10, n. 11, p. 386-401, 2015.

NASIR, P.; DÍAZ, M. T. Avian flukes of Venezuela. **Rivista di Parasitologica**, vol. 33, p. 245-276, 1972.

NAKAO, M.; SASAKI, M. Trematode diversity in freshwater snails from a stopover point for migratory waterfowls in Hokkaido, Japan: An assessment by molecular phylogenetic and population genetic analysis. **Parasitology International**, vol. 83, 102329, 2021.

NEGRELLI, D. C.; VIEIRA, D. H. M. D.; ABDALLAH, V. D.; AZEVEDO, R. K. Molecular characterization of the progenetic metacercariae *Crocodilicola pseudostoma* parasitizing *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 92, n. 2, e20181388, 2020.

NIEWWIADOMSKA, K. On two cercariae of the genus *Tylodelphys* Diesing, 1850: *T. excavata* (Rud. 1803), Szidat, 1935 and *T. clavata* (Nord. 1832) Dies. 1850. **Acta Parasitologica Polonica**, vol. 8, p. 427-437, 1960.

NIEWWIADOMSKA, K. Family Diplostomidae Poirier, 1886. *In*: GIBSON, D. I.; JONES, A.; BRAY, R. A. (Eds), **Keys to the Trematoda, Volume 1**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2002a, p. 167-196.

NIEWWIADOMSKA, K. Family Strigeidae Railliet, 1919. *In*: GIBSON, D. I.; JONES, A.; BRAY, R. A. (Eds), **Keys to the Trematoda, Volume 1**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2002b, p. 231-242.

NOLAN, M. J.; CRIBB, T. H. The life cycle of *Paracardicoloides yamagutii* Martin, 1974 (Digenea: Sanguinicolidae). **Folia Parasitologica**, vol. 51, p. 320-326, 2004.

NOLAN, M. J.; CRIBB, T. H. The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. **Advances in Parasitology**, vol. 60, p. 101-163, 2005.

NOLLEN, P. M.; KANEV, I. The taxonomy and biology of philophthalmid eye flukes. **Advances in Parasitology**, vol. 36, p. 205-269, 1995.

ODENING, K. Life cycle of *Parastrigea robusta* Szidat, 1928 (Trematoda, Strigeida) around Berlin. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, vol. 26, n. 3, p. 185-196, 1965 (Em alemão).

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

OLSON, P. D.; TKACH, V. V. Advances and trend in the molecular systematics of the parasitic Platyhelminthes. **Advances in Parasitology**, vol. 60, p. 165-243, 2005.

ONACA, F. M. T.; GRAÇA, R. J.; FABRIN, T. M. C.; TAKEMOTO, R. M.; OLIVEIRA, A. V. Molecular characterization and identification of digenean larval stages in *Aylacostoma chloroticum* (Prosobranchia: Thiaridae) from a neotropical floodplain. **Journal of Helminthology**, 94, e73, p. 1-8, 2020.

OLIVIER, L.; CORT, W. W. *Cercaria douglasi* Cort, 1917 and its relation to the cercaria of *Cotylurus flabelliformis* (Faust, 1917). **Journal of Parasitology**, vol. 27, n. 4, p. 343-346, 1941.

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

OLSON, R. E.; PIERCE, J. R. A trematode metacercaria causing gill cartilage proliferation in steelhead trout from Oregon. **Journal of Wildlife Diseases**, vol. 33, n. 4, p. 886-890, 1997.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M. Trematoda. Familias Strigeidae, Diplostomidae, Schistosomatidae, Spirorchiidae y Bucephalidae. **Fauna de Agua Dulce de la República Argentina**. Buenos Aires: PROFADU (CONITEC), 1992. vol. 9, p. 1-55.



OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M. Life cycle of *Stephanoprora uruguayense* (Digenea: Echinostomatidae) in Argentina. **Journal of Parasitology**, vol. 93, n. 5, p. 1090-1096, 2007.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M. Redescription of *Austrodiplostomum compactum* (Trematoda: Diplostomidae) from its type host and locality in Venezuela, and of *Austrodiplostomum mordax* from Argentina. **Journal of Parasitology**, vol. 103, n. 5, p. 497-505, 2017.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M.; QUAGGIOTTO, A. Trematodes larvales (Digenea) de las familias Diplostomidae, Strigeidae y Echinostomatidae em la Región Patagónica Argentina. **Boletín Chileno de Parasitología**, vol. 50, p. 28-33, 1995.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M.; QUINTANA, M. G. The life cycle of *Stephanoprora aylacostoma* n. sp. (Digenea: Echinostomatidae), parasite of the threatened snail *Aylacostoma chloroticum* (Prosobranchia, Thiaridae), in Argentina. **Parasitology Research**, vol. 102, n. 4, p. 647-655, 2008.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M.; QUINTANA, M. G.; LACKZKÓ, A. C. M. The life cycle of *Heterophyes yacyretana* n. sp. (Digenea, Heterophyidae), parasitic in the endemic snail *Aylacostoma chloroticum* (Caenogastropoda, Thiaridae) in Argentina. **Journal of Parasitology**, vol. 106, n. 5, p. 625-632, 2020.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M.; SPATZ, L.; GONZÁLES CAPP, S. M. New intermediate hosts in the life cycle of *Zygocotyle lunata* in South America. **Journal of Parasitology**, vol. 89, n. 1, p. 193-194, 2003.

OUTA, J. P.; SATTMAN, H.; KÖHSLER, M.; WALOCHNIK, J.; JIRSA, F. Diversity of digenean trematode larvae in snails from Lake Victoria, Kenya: First reports and bioindicative aspects. **Acta Tropica**, vol. 206, 105437, 2020.

PADIAL, J. M.; MIRALLES, A.; RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. **Frontier in Zoology**, vol. 7, n. 1, p. 1-14, 2010.

PANTE, E.; SCHOELINCK, C.; PUILLANDRE, N. From integrative taxonomy to species description: one step beyond. **Systematic Biology**, vol. 64., n. 4, p. 152-160, 2015.

PANTOJA, C. S.; HERNÁNDEZ-MENA, D. I.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; LUQUE, J. L. Phylogenetic position of *Pseudosellacotyla lutzi* (Freitas, 1941), a parasite of *Hoplias malabaricus* (Bloch) in South America, through 28S rDNA sequences, and

new observations of the ultrastructure of their tegument. **Journal of Parasitology**, vol. 104, n. 5, p. 530-538, 2018.

PANTOJA, C.; SCHOLZ, T.; LUQUE, J. L.; JONES, A. First molecular assessment of the interrelationships of cladorchiid digeneans (Digenea: Paramphistomoidea), parasites of Neotropical fishes, including descriptions of three new species and new host and geographical records. **Folia Parasitologica**, vol. 66, e011, 2019.

PAULA-ANDRADE, C.; PINTO, H. A.; COSCARELLI, D.; VIDIGAL, T. H. D. A.; MELO, A. L. The natural infection of *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) (Mollusca: Gastropoda) by *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Platyhelminthes: Trematoda) in Paranoá lake, Brasília, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 72, n. 2, p. 419-420, 2012.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivo do Museu Nacional**, vol 55, p. 105-128, 1975.

PARK, C. W.; KIM, J. S.; JOO, H. S.; KIM, J. A human case of *Clinostomum complanatum* infection in Korea. **Korean Journal of Parasitology**, vol. 47, n. 7; p. 401-404, 2009.

PEREIRA, D.; MANSUR, M. C. D.; PIMPÃO, D. M. Identificação e diferenciação dos bivalves límnicos invasores dos demais bivalves nativos do Brasil. *In*: MANSUR, M. C. D.; SANTOS, C. P.; PEREIRA, D.; PAZ, I. C. P.; ZURITA, M. L. L.; RODRIGUEZ, M. T. R.; NEHRKE, M. V.; BERGONCI, P. E. A. (Eds), **Moluscos límnicos invasores no Brasil: biologia, prevenção e controle**. Porto Alegre, Redes, 2012, p. 75-94.

PEARSON, J. C. A phylogeny of life-cycle patterns of the Digenea. **Advances in Parasitology**, vol. 10, p. 153-189, 1972.

PEARSON, J. Family Heterophyidae Leiper, 1909. *In*: BRAY, R. A.; GIBSON, D. I.; JONES, A. (Eds), **Keys to the Trematoda, Volume 3**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2008, p. 113-141.

PELEGRINI, L. S.; GIÃO, T.; VIEIRA, D. H. M. D.; MÜLLER, M. I.; SILVA, R. J.; PÉREZ-PONDE DE LEÓN, G.; AZEVEDO, R. K.; ABDALLAH, V. D. 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**, vol. 118, n. 7, p. 2169-2189, 2019.

PÉREZ-CAICEDO, A.; LENIS, C.; VÉLEZ-ESCOBAR, I.; BECHARA-ESCUADERO, M. Nuevo registro de *Pseudosellacotyla lutzi* (Digenea: Faustilidae) en *Hoplias malabaricus* (Pisces: Erythrinidae) en Chocó, Colombia. **Revista Investigación, Biodiversidad y Desarrollo**, vol. 29, n. 1, p. 110-112, 2009.

PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; HERNÁNDEZ-MENA, D. I. Testing the higher-level phylogenetic classification of Digenea (Platyhelminthes, Trematoda) based on nuclear rDNA sequences before entering the age of the 'next generation' Tree of Life. **Journal of Helminthology**, vol. 93, n. 3, p. 260-276, 2019.

PERKINS, S. L.; MARTINSEN, E. S.; FALK, B. G. Do molecules matter more than morphology) Promises and pitfalls in parasites. **Parasitology**, vol. 138, n. 13, p. 1664-1674, 2011.

PINTO, H. A. **Biologia e Taxonomia de trematódeos transmitidos por moluscos dulciaquícolas na represa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil**. 299 p. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PINTO, H. A.; BRANT, S. V.; MELO, A. L. *Physa marmorata* (Mollusca: Physidae) as a natural intermediate host of *Trichobilharzia* (Trematoda: Schistosomatidae), a potential causative agente of avian cercarial dermatitis in Brazil. **Acta Tropica**, vol. 138, p. 38-43, 2014.

PINTO, H. A.; CAFFARA, M.; FIORAVANTI, M. L.; MELO, A. L. Experimental and molecular study of cercariae of *Clinostomum* sp. (Trematoda: Clinostomidae) from *Biomphalaria* spp. (Mollusca: Planorbidae) in Brazil. **Journal of Parasitology**, vol. 101, n. 1, p. 108-113, 2015a.

PINTO, H. A.; GRIFFIN, M. J.; QUINIQU, S. M.; WARE, C.; MELO, A. L. *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) as an intermediate host of *Drepanocephalus* spp. (Trematoda: Echinostomatidae) in Brazil: a morphological and molecular study. **Parasitology Research**, vol. 115, p. 51-62, 2016.

PINTO, H. A.; JADIN, R. C.; ORLOSKE, S. A.; JOHNSON, T. J.; MELO, A. L. *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) as an intermediate host of *Ribeiroia* sp. (Trematoda: Psilostomatidae) in Brazil. **Journal of Parasitology**, vol. 99, n. 5, p. 914-918, 2013.

PINTO, H. A.; MATI, V. L. T.; MELO, A. L. Dermatite cercariana por esquistossomatídeos de aves: É possível a ocorrência de casos no Brasil? **Revista de Patologia Tropical**, vol. 41, n. 1, p. 1-14, 2012.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. *Melanoides tuberculata* as intermediate host of *Centrocestus formosanus* in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 52, n. 4, p. 207-210, 2010a.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. *Melanoides tuberculata* as intermediate host of *Philophthalmus gralli* in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 52, n. 6, p. 323-327, 2010b.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. *Physa marmorata* (Mollusca: Physidae) as intermediate host of *Echinostoma exile* (Trematoda: Echinostomatidae) in Brazil. **Neotropical Helminthology**, vol. 6, n. 2, p. 291-299, 2012.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. A checklist of cercariae (Trematoda: Digenea) in molluscs from Brazil. **Zootaxa**, vol. 3666, n. 4, p. 449-475, 2013a.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Planorbidae) as new intermediate hosts of the fish eye-fluke *Austrodiplostomum compactum* (Trematoda: Diplostomidae) in Brazil. **Journal of Parasitology**, vol. 99, n. 4, p. 729-733, 2013b.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. Larvas de trematódeos em moluscos do Brasil: Panorama e perspectivas após um século de estudos. **Revista de Patologia Tropical**, vol. 42, n. 4, p. 369-386, 2013c.

PINTO, H. A.; MELO, A. L.; BRANT, S. V. 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**, vol. 64, n. 4, p. 553-558, 2015b.

PINTO, H. A.; PULIDO-MURILLO, E. A.; MELO, A. L.; BRANT, S. V. Putative new genera and species of avian schistosomes potentially involved in human cercarial dermatitis in the Americas, Europe and Africa. **Acta Tropica**, vol. 176, p. 415-420, 2017.

PINTO, H. A.; BRAGA, E. A.; MATI, V. L.; MELO, A. L.; TKACH, V. V. DNA sequences confirm low specificity to definitive host and wide distribution of the cat pathogen *Platynosomum illiciens* (= *P. fastosum*) (Trematoda: Dicrocoeliidae). **Parasitology Research**, vol. 117, p. 1975-1978, 2018.

PINTO, H. A. Pleurolophocercous and parapleurolophocercous types of cercariae: revisiting concepts. **Parasitology International**, vol. 68, p. 92-94, 2019.

PORTES, C. S.; BORGES, J. N. Current knowledge of small flukes (Digenea: Heterophyidae) from South America. **Korean Journal of Parasitology**, vol. 58, n. 4, p. 373-386, 2020.

PLATT, T. R. Family Spirorchiidae Stunkard, 1921. *In*: GIBSON, D. I.; JONES, A.; BRAY, R. A. (Eds), **Keys to the Trematoda, Volume 1**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2002b, p. 453-467.

QUEIROZ, M. S.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; LOCKE, S. A.; PINTO, H. A.; ANJOS, L. A. Metacercariae of *Heterodiplostomum lanceolatum* (Trematoda: Proterodiplostomidae) found in *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae) from Brazil: a morphological, molecular and ecological study. **Journal of Helminthology**, vol. 94, e66, 2020.

QUEIROZ, M. S.; ALVES, P. V.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; ANJOS, L. A.; PINTO, H. A. Exploring Neotropical anuran parasites: a morphological, life cycle and phylogenetic study of *Catadiscus marinhoi*. **Parasitology**, vol. 148, n. 7, p. 798-808, 2021.

QUEIROZ, M. S. **Ciclos biológicos de trematódeos de anfíbios em um fragmento de Cerrado, Selvíria, Brasil**. 138p. Tese (Doutorado em Zoologia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.

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

QUINTANA, M. G.; OSTROWSKI, M. The life cycle of *Neocladocystis intestinalis* (Vaz, 1932) (Digenea: Cryptogonimidae), in *Aylacostoma chloroticum* (Prosobranchia: Thiaridae), and *Salminus brasiliensis* (Characiformes: Characidae), in Argentina. **Parasitology Research**, vol. 115, n. 7, p. 2589-2695, 2016.

RAMBAUT, A. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, vol. 67, n. 5, p. 901-904, 2018.

RAZO-MENDIVIL, U.; PÉREZ-PONDE DE LEÓN. Testing the evolutionary and biogeographical history of *Glypthelmins* (Digenea: Plagiorchiida), a parasite of anurans,

through a simultaneous analysis of molecular and morphological data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, vol. 59, n. 2, p. 331-341, 2011.

REDMOND, M. D.; HARTSON, R. B.; HOVERMAN, J. T.; JESÚS-VILLANUEVA, C. N.; JOHNSON, P. T. J. Experimental exposure of *Helisoma trivolvis* and *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) to *Ribeiroia ondatrae* (Trematoda). **Journal of Parasitology**, vol. 97, n. 6, n. 1055-1061, 2011.

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

ROSA, L. A. S. **Segurança Hídrica: Um olhar sobre a Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco**. 2019. 190 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Sustentável) – Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

ROSSER, T. G.; ALBERSON N. R.; KHOO, L. H.; WOODYARD, E. T.; POTE, L. M.; GRIFFIN, M. J. Characterization of the life cycle of a fish eye fluke, *Austrodiplostomum ostrowskiae* (Digenea: Diplostomidae), with notes on two other diplostomids infecting *Biomphalaria havanensis* (Mollusca: Planorbidae) from catfish aquaculture ponds in Mississippi, USA. **Journal of Parasitology**, vol. 102., n. 2, p. 260-274, 2016.

ROSSER, T. G.; BAUMGARTNER, W. A.; ALBERSON, N. R.; NOTO, T. W. *Clinostomum poteae* n. sp. (Digenea, Clinostomidae), in the trachea of a double-crested cormorant *Phalacrocorax auritus* Lesson, 1831 and molecular data linking the life-cycle stages of *Clinostomum album* Rosser, Alberson, Woodyard, Cunningham, Pote & Griffin, 2017 in Mississippi, USA. **Systematic Parasitology**, v. 95, p. 543-566, 2018.

RUIZ, J. M. Contribuição ao estudo das formas larvárias de trematóides brasileiros. 5. Descrição de três furcocercárias que ocorrem em planorbídeos hospedeiros de *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Butantan**, vol. 25, p. 77-89, 1953.

SABAS, C. S. S.; BRASIL-SATO, M. C. 2014. Helminth fauna parasitizing *Pimelodus pohli* (Actinopterygii: Pimelodidae) from the upper São Francisco River. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, vol. 23, n. 3, p. 375-382, 2014.

SANTI, M.; ANDRÉ, M. R.; LUX HOPPE, E. G.; WERTHER, K. Renal trematode infection in wild birds: histopathological, morphological, and molecular aspects. **Parasitology Research**, vol. 117, n. 3, p. 883-891, 2018.

SANTOS-CLAPP, M. D.; BRASIL-SATO, M. C. Parasite community of *Cichla kelberi* (Perciformes: Cichlidae) in the Três Marias Reservoir, Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, vol. 23, n. 3, p. 367-374, 2014.

SCHELL, S. C (Ed.). **How to know the trematodes**. 3rd ed. Dubuque: W. C. Brown Company Publishers, 1970. 355 p.

SCHELL, C. S. The life history of *Sanguinicola idahoensis* sp. n. (Trematoda: Sanguinicolidae), a blood parasite of stellhead trout, salmo *Gairdneri* Richardson. **Journal of Parasitology**, vol. 60, n. 4, p. 561-566, 1974.

SCHWELM, J.; SELBACH, C.; KREMERS, J. SURES, B. Rare inventory of trematode diversity in a protected natural reserve. **Scientific Reports**, vol. 11, n. 1, p. 1-13, 2021.

SCHOLZ, T.; DITRICH, O.; VARGAS-VÁZQUEZ. *Echinochasmus leopoldinae* n. sp. (Trematoda: Echinostomatidae) on data on its life cycle. **Systematic Parasitology**, vol. 33, p. 157-165, 1996.

SCHOLZ, T.; AGUIRRE-MACEDO, M. L.; DÍAZ DE LEÓN, A. T. S. F.; DITRICH, O. Larval stages of trematodes in Mexican freshwater molluscs: a review of present state and methodology for future research. *In*: SALGADO-MALDONADO, G.; GARCÍA-ALDRETE, A. N.; VIDAL-MARTÍNEZ, V. M. (Eds), **Metazoan parasites in the neotropic: a systematic and ecological perspective**. México, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 2000, p. 77-100.

SCHUNCK, F.; PIACENTINI, V. D. Q.; SOUZA, E. A.; REGO, M. A.; ALBANO, C.; NUNES, M. F. C.; FAVARO, F. L.; NETO, I. S.; MARIANO, E. F.; LIMA, D. M.; LASCASAS, F. M. G.; RODRIGUES, R. C.; NETO, F. P. F. Birds of the Lower Middle São Francisco River. **Revista Brasileira de Ornitologia**, vol. 20, n. 3, p. 350-364, 2012.

SCWARZ, G. Estimating the dimension of a model. **The Annals of Statistics**, vol. 6, n. 2, p. 461-464, 1978.

SERENO-URIBE, A. L.; PINACHO-PINACHO, C. D.; GARCÍA-VARELA, M.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. Using mitochondrial and ribosomal DNA sequences to test the taxonomic validity of *Clinostomum complanatum* Rudolphi, 1814 in fish-eating birds and freshwater fishes in Mexico, with the description of a new species. **Parasitology Research**, vol. 112, p. 2855-2870, 2013.

SERENO-URIBE, A. L.; LÓPEZ-JIMÉNEZ, A.; ANDRADE-GÓMEZ, L.; GARCÍA-VARELA, M. A morphological and molecular study of adults and metacercariae of

*Hysteromorpha triloba* (Rudolphi, 1819), Lutz 1931 (Diplostomidae) from the Neotropical region. **Journal of Helminthology**, vol. 93, n. 1, 91-99, 2018.

SERENO-URIBE, A. L.; GÓMEZ, L. A.; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; GARCÍA-VARELA, M. Assessing the taxonomic validity of *Austrodiplostomum* spp. (Digenea: Diplostomidae) through nuclear and mitochondrial data. **Journal of Parasitology**, vol. 105, n. 1, p. 102-112, 2019.

SEITNER, P. G. Studies on five new species of xiphidiocercariae of the virgule type. **Journal of Parasitology**, vol. 31, n. 4, p. 272-281, 1945.

SILVA, B. A. F.; DIAS, K. G. A.; SILVA, R. J.; YAMADA, F. H. A new species of *Wallinia* Pearse, 1920 (Digenea: Allocrediidae), in *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characidae) in Northeast Brazil, based on morphological and DNA sequences. **Parasitology Research**, vol. 120, n. 1, p. 37-44, 2021.

SHCHENKOV, S. V.; DENISOVA, S. A.; KREMNEV, G. A.; DOBROVOLSKIJ, A. A. Five new morphological types of virgulate and microcotylous xiphocercariae based on morphological and molecular phylogenetic analyses. **Journal of Helminthology**, vol. 94, e94, p. 1-12, 2020.

SIMONE, L. R. L. **Land and freshwater molluscs of Brazil**. São Paulo: EGB/FAPESP, 2006. 390 p.

SMITH, J. W. Family Sanguinicolidae von Graff, 1907. In: GIBSON, D. I.; JONES, A.; BRAY, R. A. **Keys to the Trematoda, Volume 1**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, p. 433-452, 2002.

SNYDER, S. D. Phylogeny and paraphyly among tetrapod blood flukes (Digenea: Schistosomatidae and Spirorchiiidae). **International Journal for Parasitology**, vol. 34, n. 12, p. 1385-1392, 2004.

SOLDÁNOVÁ, M.; GEORGIEVA, S.; ROHÁČOVÁ, J.; KNUDSEN, R.; KUHN, J. A.; HENRIKSEN, E. H.; SIWERTSSON, A.; SHAW, J. C.; KURIS, A. M.; AMUNDSEN, P.; SCHOLZ, T.; LAFFERTY, K. D.; KOSTADINOVA, A. Molecular analyses reveal high species diversity of trematodes in a sub-Arctic lake. **International Journal for Parasitology**, vol. 47, n. 6, p. 327-345, 2017.

SONG, L. G.; WU, X. Y.; SACKO, M.; WU, Z. D. History of schistosomiasis epidemiology, current status, and challenges in China: on the road to schistosomiasis elimination. **Parasitology Research**, vol. 115, n. 11, p. 4071-4081, 2016.



SUGIHARA, Y.; YAMADA, T.; TAMAKI, A.; YAMANISHI, R.; KANAI, K. Larval stages of the Bluefin tuna blood fluke *Cardicola opisthorchis* (Trematoda: Aporocotylidae) found from *Terebella* sp. (Polychaeta: Terebellidae). **Parasitology International**, vol. 63, n. 2, p. 295-299, 2014.

SULLIVAN, J. J.; BYRD, E. E. *Choledocystus pennsylvaniensis*: Life history. **Transactions of the American Microscopical Society**, vol. 89, n. 3, p. 384-396, 1970.

TATONOVA, Y. V.; IZRAILSKAIA, A. V.; BESPROZVANNYKH, V. V. *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 Edhner, 1910. **Parasitology**, vol. 147, n. 13, p. 1469-1479, 2020.

THOMPSON, H.; GIBSON, T. J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, vol. 22, p. 4673-4680, 1994.

TKACH, V. V. Family Plagiorchiidae Lühe, 1901. *In*: BRAY, R. A.; GIBSON, D. I.; JONES, A. (Eds), **Keys to the Trematoda, Volume 3**. London, CABI Publishing and The Natural History Museum, 2008a, p. 295-325.

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

TKACH, V. V.; KUDLAI, O.; KOSTADINOVA, A. Molecular phylogeny and systematics of the Echinostomatoidea Looss, 1899 (Platyhelminthes: Digenea). **International Journal of Parasitology**, vol. 46, n. 3, p. 171-185, 2016.

TRAVASSOS, L.; FREITAS, J. F.; KOHN, A. Trematódeos do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 67, n. 1; p. 1-886, 1969.

VAN STEENKISTE, A.; LOCKE, S. A.; CASTELIN, M.; MARCOGLIESE, D. J.; ABBOTT, C. L. New primers for DNA barcoding of digeneans and cestodes (Platyhelminthes). **Molecular Ecology Resources**, vol. 15, n. 4, p. 945-952, 2015.

VALADÃO, M. C.; SILVA, B. C. M.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; ARAÚJO, J. V.; LOCKE, S. A.; PINTO, H. A. A molecular phylogenetic study of the caecal fluke of poultry, *Postharmostomum commutatum* (= *P. gallinum*) (Trematoda: Brachylaimidae). **Parasitology Research**, vol. 118, p. 3927-3934, 2018.

VALADÃO, M. C.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; ALVES, P. A.; PINTO, H. A. A new species of *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) from the 'reolutum' group found in Brazil: refuting the occurrence of *Echinostoma miyagawai* (= *E. robustum*) in the Americas. **Parasitology**, p. 1-41, 2021.

VICENTE, J. J.; SANTOS, E. S.; SOUZA, S. V. Helminths of fishes of Amazonian rivers of the Coleção do Instituto Oswaldo Cruz. I. Trematoda. **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, vol. 25, p. 9-16, 1978.

VASCONCELOS, A. C. P. *et al.* Molecular analysis and biodiversity of metazoan parasites of the yellow tail lambari, *Astyanax aff. bimaculatus* (Teleostei, Characidae), in lower San Francisco, Northeastern Brazil. **Neotropical Helminthology**, vol. 7, n. 1, p. 41-49, 2013.

VITAL, J. F.; GOMES, E. A.; MOREY, G. A. M.; MALTA, J. C. O. Metacercariae of *Tylodelphys* sp. (Diplostomidae) parasitizing fish from Brazilian Amazon floodplain lakes. **Neotropical Helminthology**, vol. 12, n. 1, p. 33-40, 2018.

WANG, M. L.; CHEN, H. Y.; SHIH, H. H. Occurrence and distribution of yellow grub trematodes (*Clinostomum complanatum*) infection in Taiwan. **Parasitology Research**, v. 116, n. 6, p. 1761-1771, 2017.

WEST, A. F. Studies on the biology of *Philophthalmus gralli* Mathis and Leger, 1910 (Trematoda: Digenea). **American Midland Naturalist**, vol. 66, n. 2, p. 363-383, 1961.

WHITFIELD, P. J. 2009. Trematoda: form, function and classification of digeneans. In: ROBERTS, L. S.; JANOVY JUNIOR, J. **Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology**. Boston: McGraw-Hill Higher Education, 2009, p. 219-245.

WILSON, W. D.; JOHNSON, T. J.; SUTHERLAND, D. R.; MONÉ, H.; LOKER, E. S. A molecular phylogenetic study of the genus *Ribeiroia* (Digenea): trematodes known to cause limb malformations in amphibians. **Journal of Parasitology**, vol. 91, n. 5, p. 1040-1045, 2005.

XIMENES, R. F.; GONÇALVES, I. C. B.; MIYAHIRA, I. C.; PINTO, H. A.; MELO, A. L.; SANTOS, S. B. *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in *Melanoides tuberculata* (Gastropoda: Thiaridae) from Vila do Abraão, Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 77, n. 2, p. 318-322, 2017.

YAMAGUTI, S. **A synoptical review of life histories of digenetic trematodes of vertebrates with special reference to the morphology of their larval forms**. Tokyo, Japan: Keigaku Publishers, 1975. 590 p.

ZELLHUBER, A.; SIQUEIRA, R. Rio São Francisco em descaminho: degradação e revitalização. **Cadernos do CEAS: Revista crítica de humanidades**, vol. 227, p. 3-24, 2016.

## APÊNDICE 1

Número de moluscos coletados, infectados e taxa de infecção por larvas de trematódeos verificados nas 32 coletas realizadas entre os meses de julho de 2017 e agosto de 2019 nos pontos A e B, localizados no rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. Col: coletados, Inf: infectados. <sup>A</sup>: Ponto A; <sup>B</sup>: Ponto B.

	Datas	<i>Aylacostoma tuberculatum</i>			<i>A. chloroticum</i>			<i>Biomphalaria occidentalis</i>		<i>Melanooides tuberculata</i>			<i>Stenophysa marmorata</i>		<i>Pomacea</i> sp.	
		Col	Inf	%	Col	Inf	%	Col	Inf	Col	Inf	%	Col	Inf	Col	Inf
1 <sup>A</sup>	31/07/2017	65	5	7,69	4	0	-	0	-	6	0	-	0	-	0	-
2 <sup>A</sup>	01/08/2017	117	15	12,82	20	0	-	0	-	15	1	6,67	0	-	0	-
3 <sup>B</sup>	02/08/2017	175	7	4	14	1	7,14	0	-	3	0	-	0	-	0	-
4 <sup>B</sup>	31/08/2017	103	14	13,59	117	1	0,85	0	-	8	0	-	0	-	0	-
5 <sup>B</sup>	01/09/2017	137	7	5,11	31	1	3,23	0	-	0	-	-	12	-	0	-
6 <sup>B</sup>	02/09/2017	153	0	-	24	0	-	0	-	0	-	-	0	-	0	-
7 <sup>A</sup>	05/10/2017	204	1	0,49	10	0	-	0	-	14	0	-	10	0	0	-
8 <sup>B</sup>	06/10/2017	154	1	0,65	20	1	5	0	-	0	-	-	0	-	0	-
9 <sup>A</sup>	08/10/2017	34	1	2,94	5	0	-	0	-	1	0	-	0	-	0	-
10 <sup>B</sup>	09/10/2017	24	1	4,17	154	0	-	0	-	1	0	-	0	-	0	-
11 <sup>A</sup>	01/02/2018	115	4	3,48	7	0	-	0	-	17	0	-	0	-	1	0
12 <sup>B</sup>	02/02/2018	137	7	5,11	46	0	-	0	-	0	-	-	0	-	0	-
13 <sup>A</sup>	28/03/2018	12	2	16,67	7	1	14,29	0	-	44	0	-	0	-	2	0
14 <sup>B</sup>	29/03/2018	95	1	1,05	24	0	-	0	-	0	-	-	0	-	0	-
15 <sup>B</sup>	30/03/2018	0	-	-	0	-	-	8	0	255	0	-	0	-	16	0
16 <sup>B</sup>	31/03/2018	93	0	-	8	0	-	0	-	0	-	-	0	-	0	-
17 <sup>A</sup>	25/05/2018	141	19	13,48	38	0	-	0	-	6	0	-	0	-	0	-

*Apêndice 1 – Continuação...*

Datas	<i>Aylacostomum tuberculatum</i>			<i>A. chloroticum</i>			<i>Biomphalaria occidentalis</i>		<i>Melanoides tuberculata</i>			<i>Stenophysa marmorata</i>		<i>Pomacea</i> sp.		
	Col	Inf	%	Col	Inf	%	Col	Inf	Col	Inf	%	Col	Inf	Col	Inf	
18 <sup>B</sup>	26/05/2018	120	2	1,67	61	0	-	0	-	0	-	-	0	-	0	-
19 <sup>A</sup>	25/07/2018	175	10	5,71	24	0	-	0	-	2	0	-	0	-	0	-
20 <sup>B</sup>	28/07/2018	156	10	6,94	47	0	-	0	-	0	-	-	0	-	0	-
21 <sup>B</sup>	15/09/2018	102	3	2,94	73	1	1,37	0	-	0	-	-	0	-	1	0
22 <sup>B</sup>	20/10/2018	238	12	5,04	2	0	-	0	-	0	-	-	0	-	3	0
23 <sup>B</sup>	22/10/2018	158	14	8,86	3	0	-	0	-	0	-	-	0	-	0	-
24 <sup>B</sup>	20/04/2019	111	13	11,71	84	1	1,19	0	-	0	-	-	0	-	0	-
25 <sup>B</sup>	21/04/2019	53	7	13,21	31	1	3,23	0	-	0	-	-	0	-	0	-
26 <sup>B</sup>	25/05/2019	48	10	20,83	71	2	2,82	0	-	0	-	-	0	-	0	-
27 <sup>B</sup>	23/06/2019	121	12	9,92	143	0	-	0	-	28	-	-	0	-	0	-
28 <sup>B</sup>	21/07/2019	80	15	18,75	56	0	-	0	-	3	0	-	0	-	0	-
29 <sup>A</sup>	22/07/2019	143	18	12,59	20	1	5	0	-	14	0	-	0	-	0	-
30 <sup>B</sup>	22/08/2019	127	10	7,87	28	0	-	0	-	0	-	-	0	-	0	-
31 <sup>B</sup>	23/08/2019	208	7	3,37	4	0	-	0	-	0	-	-	0	-	0	-
32 <sup>B</sup>	24/08/2019	126	10	7,94	116	0	-	0	-	0	-	-	0	-	0	-
<b>Total</b>		<b>3725</b>	<b>238</b>	<b>6,39</b>	<b>1292</b>	<b>11</b>	<b>0,85</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>417</b>	<b>1</b>	<b>0,24</b>	<b>22</b>	<b>0</b>	<b>23</b>	<b>0</b>

## APÊNDICE 2

Número de moluscos coletados, infectados e taxa de infecção por larvas de trematódeos verificados nas 32 coletas realizadas entre os meses de julho de 2017 e agosto de 2019 no ponto C, localizado no Rio São Francisco, Januária, Minas Gerais. Col: coletados, Inf: infectados.

Data	Ancylineae gen. sp.			<i>Biomphalaria straminea</i>			<i>B. occidentalis</i>			<i>Melanoides tuberculata</i>			<i>Stenophysa marmorata</i>		<i>Pomacea</i> sp.		<i>Pseudosuccinea columella</i>	
	Col	Inf	%	Col	Inf	%	Col	Inf	%	Col	Inf	%	Col	Inf	Col	Inf	Col	Inf
1	03/09/2017	5	0	-	21	0	-	0		29	0	-	2	0	6	0	4	0
2	07/10/2017	3	0	-	73	1	1,37	0		29	0	-	3	0	5	0	8	0
3	03/02/2018	0	-	-	28	0	-	0		66	1	1,52	4	0	0	-	1	0
4	27/03/2018	0	-	-	7	0	-	0		3	0	-	1	0	4	0	0	-
5	01/04/2018	1	0	-	6	0	-	0		0	-	-	3	0	21	0	0	-
6	27/05/2018	24	1	4,17	32	2	6,25	15	0	1	0	-	1	0	26	0	0	-
7	28/05/2018	0	-	-	50	2	4	0		0	-	-	0	-	0	-	0	-
8	29/05/2018	97	4	4,12	52	2	3,85	21	0	0	-	-	2	0	18	0	0	-
9	26/07/2018	0	-	-	102	0	-	9		0	-	-	0	-	0	-	0	-
10	27/07/2018	0	-	-	178	1	0,56	0		0	-	-	26	0	2	0	0	-
11	29/07/2018	0	-	-	214	1	0,47	0		0	-	-	19	0	0	-	0	-
12	30/07/2018	0	-	-	434	2	0,46	0		43	0	-	0	-	2	0	0	-
13	11/09/2018	0	-	-	448	4	3,48	0		0	-	-	28	0	1	0	0	-
14	13/09/2018	0	-	-	494	3	0,81	0		0	-	-	0	-	0	-	0	-
15	14/09/2018	0	-	-	24	0	0	0		0	-	-	0	-	0	-	0	-
16	18/10/2018	0	-	-	61	2	3,28	0		0	-	-	11	0	0	-	0	-
17	19/10/2018	0	-	-	101	4	3,96	0		0	-	-	4	0	0	-	0	-

## Apêndice 2 – Continuação...

Data	Ancylinae gen. sp.			<i>Biomphalaria straminea</i>			<i>B occidentalis</i>			<i>Melanoides tuberculata</i>			<i>Stenophysa marmorata</i>		<i>Pomacea</i> sp.		<i>Pseudosuccinea columella</i>		
	Col	Inf	%	Col	Inf	%	Col	Inf	%	Col	Inf	%	Col	Inf	Col	Inf	Col	Inf	
18	17/04/2019	11	0	-	12	0	-	0	-	-	0	-	-	29	0	30	0	0	-
19	22/05/2019	0	-	-	203	8	3,94	47	0	-	1	0	-	64	0	2	-	0	-
20	23/05/2019	0	-	-	155	12	7,74	12	0	-	0	-	-	10	0	4	-	7	0
21	24/05/2019	0	-	-	87	1	1,15	33	0	-	0	-	-	0	-	0	-	0	-
22	27/05/2019	3	0	-	91	4	4,40	29	0	-	0	-	-	11	0	0	0	6	0
23	19/06/2019	0	-	-	184	2	1,09	46	0	-	0	-	-	3	0	0	-	0	-
24	20/06/2019	0	-	-	151	0	-	30	0	-	0	-	-	15	0	0	-	0	-
25	21/06/2019	0	-	-	207	2	0,97	42	0	-	0	-	-	3	0	0	-	1	0
26	22/06/2019	0	-	-	360	6	1,67	27	0	-	0	-	-	1	0	0	-	0	-
27	17/07/2019	0	-	-	40	1	2,50	24	0	-	0	-	-	4	0	0	-	1	0
28	18/07/2019	0	-	-	17	0	-	30	0	-	0	-	-	1	0	0	-	0	-
29	19/07/2019	0	-	-	49	1	2,04	20	0	-	0	-	-	1	0	0	-	0	-
30	20/07/2019	0	-	-	492	7	1,42	132	1	0,01	0	-	-	10	0	0	-	0	-
31	20/08/2019	0	-	-	168	14	8,33	43	0	-	0	-	-	2	0	0	-	0	-
32	21/08/2019	0	-	-	265	30	11,3	112	0	-	1	-	-	6	0	0	-	0	-
<b>Total</b>		<b>144</b>	<b>5</b>	<b>3,47</b>	<b>4806</b>	<b>112</b>	<b>2,33</b>	<b>672</b>	<b>1</b>	<b>0,15</b>	<b>173</b>	<b>1</b>	<b>0,58</b>	<b>267</b>	<b>0</b>	<b>121</b>	<b>0</b>	<b>28</b>	<b>0</b>

### APÊNDICE 3

Lista de trematódeos digenéticos descritos no Brasil envolvendo o uso de ferramentas moleculares.

<b>Espécies</b>	<b>Marcador (es)</b>	<b>Referências</b>
<b>Allocreadiidae</b>		
<i>Creptotrema creptotrema</i>	28S e <i>cox1</i>	FRANCESCHINI et al., 2021
<i>C. conconae</i>	28S e <i>cox1</i>	
<i>C. megacetabularis</i>	28S e <i>cox1</i>	
<i>C. schubarti</i>	28S e <i>cox1</i>	
<i>Creptotrematina batalhensis</i>	28S	DIAS et al., 2020
<i>W. brasiliensis</i>	28S	DIAS et al., 2018
<i>Wallinia caririensis</i>	28S	SILVA et al., 2020
<b>Brachycoeliidae</b>		
<i>Mesocoelium lanfrediae</i>	18S	GOMES, T. F. F. et al., 2013
<b>Brachylaimidae</b>		
<i>Postharmostomum commutatum</i>	28S, ITS2, <i>cox1</i>	VALADÃO et al., 2018
<b>Cladorchiidae</b>		
Cladorchiidae gen. sp.	28S	PANTOJA et al., 2019
<i>Dadaytrema gracile</i>	28S e ITS2	PANTOJA et al., 2019
<i>Dadaytrema minimum</i>	28S e ITS2	PANTOJA et al., 2019
<i>Doradamphistoma bacuense</i>	28S	PANTOJA et al., 2019
<i>Doradamphistoma parauchenipteri</i>	28S	PANTOJA et al., 2019
<i>Pseudocladorchis nephrodorchis</i>	28S	PANTOJA et al., 2019
<b>Clinostomidae</b>		
<i>Clinostomum detruncatum</i>	ITS e <i>cox1</i>	ACOSTA et al., 2016
<i>Clinostomum</i> sp.	ITS e <i>cox1</i>	PINTO et al., 2015a
<b>Cryptogonomidae</b>		
<i>Pseudosellacotyla lutzi</i>	28S	PANTOJA et al., 2018
<b>Dicrocoeliidae</b>		
<i>Anenterotrema auritum</i>	28S e <i>cox1</i>	FERNANDES et al., 2021
<i>A. stunkardi</i>	28S e <i>cox1</i>	
<i>Eurytrema coelomaticum</i>	18S	FIGUEIRA et al., 2014
<i>Infidum infidum</i>	28S	MÜLLER et al., 2021
<i>Platynosomum illiciens</i>	ITS, 28S e <i>cox1</i>	PINTO et al., 2018
<b>Didymozoidae</b>		
<i>Brasicystis bennetti</i>	ITS1-5.8S-ITS2	MELO et al., 2013
<b>Diplodiscidae</b>		
<i>Diplodiscus marinholutzi</i>	28S	QUEIROZ et al., 2021
<b>Diplostomidae</b>		
<i>Austrodiplostomum compactum</i>	ITS1-5.8S-ITS2 e <i>cox1</i>	LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019
Crassiphialinae gen. sp.	ITS1-5.8S-ITS2 e <i>cox1</i>	LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019
Diplostomidae gen. sp.	<i>cox1</i>	PELEGRINI et al., 2019



## Apêndice 3 – Continuação...

<i>Posthodiplostomum nanum</i>	ITS e <i>cox1</i>	LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2018
<i>Tylodephys</i> sp.	<i>cox1</i>	PELEGRINI et al., 2019
<b>Echinostomatidae</b>		
<i>Drepanocephalus mexicanus</i>	18S, ITS1-5.8S-ITS2, 28S, <i>cox1</i> , <i>nad1</i>	PINTO et al., 2016
<i>D. spathans</i>	18S, ITS1-5.8S-ITS2, 28S, <i>cox1</i> , <i>nad1</i>	
<i>Echinostoma paraensei</i>	ITS1-5.8S-ITS2	MALDONADO et al., 2001
<i>E. pseudorobustum</i>	28S, ITS1-5.8S-ITS2, <i>nad1</i>	VALADÃO et al., 2021
<i>Ribeiroia</i> sp.	ITS1	PINTO et al., 2013
<b>Eucotylidae</b>		
<i>Paratanaisia confusa</i>	18S e 28S	SANTI et al., 2018
<b>Fasciolidae</b>		
<i>Fasciola hepatica</i>	28S e <i>cox1</i>	MARTINS et al., 2021
<i>Paratanaisia</i> sp.	18S e 28S	SANTI et al., 2018
<b>Gymnophallidae</b>		
<i>Parvatrema</i> sp.	ITS	DA SILVA et al., 2009
<b>Heterophyidae</b>		
<i>Ascocotyle longa</i>	18S, 28S, ITS e <i>cox1</i>	PORTES; BORGES, 2020
<i>Ascocotyle pindoramensis</i>	18S, 28S, ITS e <i>cox1</i>	PORTES; BORGES, 2020
<i>Centrocestus formosanus</i>	18S	PINTO et al., 2018
	28S	CICCHETO et al., 2021b
<i>Haplorchis pumilio</i>	28S, ITS2 e <i>cox1</i>	LOPES et al., 2020
<i>Pholeter gastrophilus</i>	28S e <i>cox1</i>	EBERT et al., 2021
<i>Pygidiopsis macrostomum</i>	18S, 28S, ITS2, <i>cox1</i>	BORGES et al., 2017
<b>Lecithodendriidae</b>		
<i>Paralecithodendrium</i> sp.	28S	ONACA et al., 2020
Lecithodendriidae gen. sp.	28S	LOPES et al., 2020
<b>Notocotylidae</b>		
<i>Hippocrepis hippocrepis</i>	28S e <i>cox1</i>	ASSIS et al., 2019
<i>Ogmogaster antarctica</i>	18S e <i>cox1</i>	EBERT et al., 2020
<b>Plagiorchiidae</b>		
<i>Travtrema stenocotyle</i>	28S	MÜLLER et al., 2021
<b>Proterodiplostomidae</b>		
<i>Crocodicola pseudostoma</i>	<i>cox1</i>	NEGRELLI et al., 2020
<i>Crocodicola pseudostoma</i>	<i>cox1</i>	NEGRELLI et al., 2020
<i>Heterodiplostomum lanceolatum</i>	28S	QUEIROZ et al., 2020
<b>Renicolidae</b>		
<i>Renicola sloanei</i>	ITS2, <i>nad1</i> e <i>cox1</i>	MATOS et al., 2019
<b>Schistosomatidae</b>		
<i>Schistosoma mansoni</i>	18S	MELO et al., 2006
Schistosomatidae gen. sp. 2	28S, ITS e <i>cox1</i>	PINTO et al., 2017
<i>Trichobilharzia</i> sp.	28S, ITS e <i>cox1</i>	PINTO et al., 2014

*Apêndice 3 – Continuação...*


---

<b>Spirorchiidae</b>		
Spirorchiidae spp.	28S	PINTO et al., 2015b
Spirorchiidae sp.	28S, <i>cox1</i>	CICCHETO et al., 2021a
<b>Strigeidae</b>		
<i>Apharyngostrigea</i> sp.	ITS1-5.8S-ITS2 e <i>cox1</i>	LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019
<i>Cotylurus</i> sp.	ITS1-5.8S-ITS2 e <i>cox1</i>	LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019
<b>Zygotilidae</b>		
<i>Zygotyle lunata</i>	28S, ITS2 e <i>cox1</i>	ALVES et al., 2020

---

## ANEXO



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 65447-1	Data da Emissão: 09/10/2018 15:27:05	Data da Revalidação*: 09/10/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: HUDSON ALVES PINTO	CPF: 061.607.746-70
--------------------------	---------------------

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Obtenção de amostras de peixes (vísceras e carcaças) para recuperação de helmintos	02/2019	02/2020

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	EDUARDO ALBERTO PULIDO MURILLO	Estudante de Doutorado	070.406.701-35	Estrangeira

#### Observações e ressalvas

1	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
2	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
3	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
4	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
5	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
6	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0654470120181009

Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 65447-1	Data da Emissão: 09/10/2018 15:27:05	Data da Revalidação*: 09/10/2019
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: HUDSON ALVES PINTO	CPF: 061.607.746-70
--------------------------	---------------------

#### Outras ressalvas

1	O pesquisador estrangeiro, EDUARDO ALBERTO PULIDO MURILLO, possui Vínculo de Bolsista de Doutorado do CNPq. Portanto, ficam dispensados de autorização do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.	COINF
---	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Rio São Francisco	Januária-MG	Cerrado	Não	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Synbranchiformes	-
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Siluriformes	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Characiformes	-
4	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Cyprinodontiformes	-

#### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Peixes)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Universidade Federal de Minas Gerais	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0654470120181009

Página 2/3

