

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Parasitologia

André Schultz Lopes

**TAXONOMIA INTEGRATIVA DE TREMATÓDEOS DA SUPERFAMÍLIA
PARAMPHISTOMOIDEA ENCONTRADOS EM RUMINANTES ABATIDOS NA
CIDADE DE PELOTAS, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Belo Horizonte

2023

André Schultz Lopes

**TAXONOMIA INTEGRATIVA DE TREMATÓDEOS DA SUPERFAMÍLIA
PARAMPHISTOMOIDEA ENCONTRADOS EM RUMINANTES ABATIDOS NA
CIDADE DE PELOTAS RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

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

Área de concentração: Helminologia

Orientador: Prof. Hudson Alves Pinto

Belo Horizonte

Julho de 2023

043

Lopes, André Schultz.

Taxonomia integrativa de trematódeos da superfamília Paramphistomoidea encontrados em ruminantes abatidos na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil [manuscrito] / André Schultz Lopes. – 2023.

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

Orientador: Prof. Hudson Alves Pinto.

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

1. Parasitologia. 2. Paramphistomatidae. 3. Trematódeos. 4. Taxonomia. 5. Pecuária. 6. Ruminantes. 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 GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ANDRÉ SCHULTZ LOPES- 457/2023/12

ENTRADA 1º/2021 - MATRICULA: 2021691106

Às **14:00** horas do dia **vinte e um de julho de 2023**, por videoconferência, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **André Schultz Lopes**. A presidência da sessão coube ao **Professor Hudson Alves Pinto** orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora constituída pelos doutores: **Camila Santos Pantoja de Oliveira**-UFMG, **Fabiano Paschoal de Oliveira**- UFMA e **Hudson Alves Pinto** UFMG, orientador. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Taxonomia integrativa de trematódeos da superfamília Paramphistomoidea encontrados em ruminantes abatidos na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil**", área de **concentração: Helminologia**. Seguiu-se a arguição pelas examinadoras e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **aprovada** a **Dissertação de Mestrado**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 21 de julho de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Hudson Alves Pinto, Professor do Magistério Superior**, em 21/07/2023, às 16:25, 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 **Camila Santos Pantoja de Oliveira, Usuária Externa**, em 29/07/2023, às 19:09, 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 **Fabiano Paschoal de Oliveira, Usuário Externo**, em 04/08/2023, às 10:17, 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, informando o código verificador **2365546** e o código CRC **011907D7**.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Hudson Alves Pinto, pela recepção no laboratório desde a graduação, pelo constante incentivo, pela compreensão em momentos difíceis, e por sempre se dedicar para me ver crescer como aluno e, principalmente, como pessoa. Seu conhecimento e sua empolgação como um mentor foram essenciais para minha chegada nesse ponto tão importante da minha carreira e da minha vida. Obrigado por todos esses anos de aprendizado constante.

Aos meus pais Hipólito e Ivani, por seu apoio e amor incondicionais que me proporcionaram um alicerce para toda minha vida. Que eu possa continuar dando orgulho a vocês e que, mesmo após tantos anos morando fora de Pelotas, vocês saibam que continuam me acompanhando no meu coração todos os dias.

A minha tia Rosane, por ser um pedaço de família que a vida me presenteou e que sempre esteve ao meu lado. Alguém de valor imensurável, que me apoiou em momentos difíceis, me motivou em todas minhas jornadas e sempre me cuidou como um filho.

A minha irmã Luisa, que sabe como a distância e o tempo são incapazes de separar uma amizade e um companheirismo que a vida uniu. Que sigamos sendo essa dupla que, independentemente da situação, sabe que sempre terá um ao outro para se apoiar.

Ao meu padrasto Fernando, que há anos entrou na minha vida e se dedicou para minha alegria, saúde e sucesso. Sempre foste alguém com quem pude contar nos melhores e piores momentos, independente da situação e dos desafios que a vida me apresentou.

A minha madrastra Vanessa, que sempre se dedicou para me proporcionar o maior conforto, diversão e parceria durante minhas visitas à Pelotas. Saibas que sempre terás um ombro amigo para os bons e maus momentos.

À Rosane Fernandes, minha querida Rô, que me viu crescer, sendo minha babá, minha parceira de risadas, das conversas sérias e das irreverentes. Essa pessoa com quem sei que posso contar, seja para conselhos ou para alegrar meu dia jogando conversa fora e deixando a vida mais leve.

A todos meus amigos de Pelotas, que conheci ao longo do ensino fundamental, médio e faculdade. Aqueles que cresceram, riram, choraram e aprenderam comigo, sempre apoiando minha vida pessoal e profissional.

A todos meus amigos de Belo Horizonte, os quais foram essenciais na minha jornada em um novo mundo, longe da família, em uma nova universidade, uma nova rotina e um novo

André. Todos que me fizeram companhia, festejaram comigo, cuidaram de mim e formaram uma família com quem sei que posso contar.

Ao meu namorado Bruno Castro, por todo o apoio, pela companhia nos melhores e piores momentos, pela constante motivação e por toda a ajuda na conclusão dessa etapa da minha vida. Que eu possa retribuir esse suporte diariamente com todo o amor que tenho para oferecer e te ajudar da mesma forma nos obstáculos que a vida nos apresenta.

A meus familiares, que sempre me recebem com amor, carinho e atenção a cada vez que vou visitar minha cidade. Sempre dispostos a me proporcionar conforto, diversão e toda a ajuda que está ao seu alcance. Cada um de vocês caminhou comigo ao longo dessa jornada.

A meus colegas de laboratório, sempre dispostos a me passar todo o conhecimento que podem, seja para a vida acadêmica, seja para a vida pessoal. Seus conselhos, orientações, brincadeiras e apoio foram fundamentais para que eu concluísse essa etapa com sucesso.

Ao professor Alan Lane de Melo, por cada momento dedicado a passar seu conhecimento, contar uma história, auxiliar nas nossas pesquisas e sempre se mostrar disposto a ajudar.

Ao Sr. Airton Lobo, sempre chegando no laboratório com um sorriso no rosto, bom humor e dedicando toda a atenção possível para auxiliar no preparo de nossas amostras. Sua expertise no preparo de lâminas foi fundamental para a realização do trabalho.

Às Sras. Sumara Aparecida Guilherme e Sibeles das Graças Guilherme Abreu, secretária do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB, UFMG. A disposição de vocês para resolução de casualidades em nossas matrículas e sistemas virtuais facilita diariamente nosso dia-a-dia.

Ao professor Demetrius da Silva Martins, por me dar oportunidades na área de biologia desde o início da minha graduação. Sua contribuição sendo meu primeiro orientador e um grande motivador de todos meus projetos são um incentivo que hoje culmina na realização do mestrado. Sempre terei a oportunidade que me deste no início da minha graduação como um marco que me permitiu atingir diversas conquistas.

À toda a equipe do SIM Pelotas, em especial à Dra. Ângela Leitzke Cabana, pela disposição a me ajudarem nesse projeto, me auxiliarem nas coletas e me fornecerem todas as informações necessárias para que eu pudesse concluir esse trabalho da melhor forma possível.

A todos os funcionários dos abatedouros visitados nesse estudo, que sempre se dispuseram a me guiar nas coletas, me ajudando a obter material para estudo e passando todo o conhecimento que possuem sobre o assunto.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Parasitologia, pelos conhecimentos e experiências transmitidas ao longo desses anos de estudo e pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado que me foi concedida.

À todas as pessoas que participaram dessa jornada ao meu lado e contribuíram de alguma forma para que eu pudesse concluir essa etapa. Muito obrigado por tudo!

Resumo

Apesar da importância econômica da pecuária para o Brasil, os helmintos parasitos de gado ainda persistem como agentes infecciosos que podem impactar a produção de carne, lã, leite e derivados. Entre os diferentes trematódeos que infectam ruminantes, destacam-se os representantes da superfamília Paramphistomoidea Fischöder, 1901, os quais possuem reconhecido potencial patogênico. No Brasil, apesar de registros da ocorrência de diferentes espécies, principalmente na região Sul do país, há ainda muitas lacunas a serem preenchidas no que se refere à taxonomia e biologia desses helmintos. Assim, o presente estudo teve como objetivo identificar, através de uma abordagem integrativa, os trematódeos encontrados em rumens de bovinos e ovinos de produção provenientes da zona rural de Jaguarão, Pelotas e Rio Grande e abatidos para consumo em Pelotas, RS, entre maio e julho de 2022. Os parasitos obtidos foram separados por morfotipos, contados e fixados para estudos morfológicos e moleculares. Para as análises morfológicas, paranfístomos obtidos em cada localidade ou espécie de hospedeiro foram processados através de diferentes técnicas helmintológicas recomendadas para esse grupo zoológico, incluindo a realização de cortes histológicos, coloração e montagem de lâminas permanentes. Estas preparações foram analisadas através de microscopia de luz, sendo realizada a caracterização morfológica, análises morfométricas e o registro fotográfico. A identificação morfológica foi realizada com o auxílio de chaves taxonômicas e descrições disponíveis na literatura. Os estudos moleculares de amostras de parasitos de diferentes morfotipos, localidades e hospedeiros (n= 11), consistiram na extração de DNA, seguida de PCR e sequenciamento de regiões do gene nuclear 28S rDNA, da região ITS-2 e de duas regiões gene mitocondrial *cox-1* (*barcode* e *pós-barcode*). As sequências obtidas foram comparadas com dados disponíveis no GenBank para representantes da superfamília Paramphistomoidea e utilizadas em análises filogenéticas. No total, 25 amostras de rumens apresentando parasitos foram analisadas, sendo obtido um total de 2969 trematódeos na parede interna dos órgãos. Dois morfotipos de paranfístomos foram identificados. O primeiro, presente em 100% das amostras obtidas, foi identificado como *Paramphistomum leydeni* Nasmark, 1937. O estudo morfológico possibilitou a visualização de estruturas diagnósticas da espécie, como a presença de papilas tegumentares em fileiras concentradas na extremidade anterior do corpo e genitália terminal do tipo leydeni. As análises moleculares realizadas com o marcador ITS-2 revelaram uma similaridade de 100% em relação a isolados de *P. leydeni* oriundos da Argentina, China, Turquia e Uruguai. Já com o marcador *cox-1*, os

isolados do Brasil apresentaram divergências genéticas entre 0,19-3,21% em relação a isolados de *P. leydeni* da Europa, suportando a identificação morfológica. Além disso, nas análises filogenéticas realizadas para esse marcador, foi verificado o agrupamento em um clado bem suportado com *P. leydeni* da China, mas com valores de divergência genética maiores (5,47-6,23%). O segundo morfotipo, identificado como *Balanorchis anastrophus* Fiscoeder, 1901, foi encontrado em cinco rumens (20%). Sua identificação morfológica se deu pela observação de características diagnósticas dos Balanorchiidae Stunkard, 1925, incluindo papilas longas e ramificadas ao redor da abertura oral, sacos faringiais extramurais, genitália terminal formando uma bolsa do cirro na porção pré-medial do corpo, útero e ovário pré-testiculares e ausência de papilas genitais. As topologias das árvores filogenéticas obtidas e as elevadas divergências genéticas verificadas para os diferentes marcadores avaliados suportaram a separação de Balanorchiidae de outros paramphistomos de ruminantes. O presente estudo confirma molecularmente a ocorrência de *P. leydeni* no Brasil, além de apresentar as primeiras sequências de exemplares do Brasil. Ademais, são obtidas as primeiras sequências moleculares de *B. anastrophus*, além de avaliar-se pela primeira vez sua posição filogenética.

Palavras-chave: paramphistomidae; balanorchiidae; pecuária; ruminantes; taxonomia; trematódeos.

Abstract

Despite the importance of livestock production to Brazil's economy, cattle flukes are still some of the most harmful infectious agents that may affect meat, wool, milk and dairy production. Among the different trematodes that infect ruminants, the Paramphistomoidea Fiscoeder, 1901 stand out for having a recognized pathogenic potential. In Brazil, despite several species being reported throughout the years, especially in the southern region, there are still several gaps when it comes to the taxonomy and biology of these helminths. Having said that, the present study aimed to identify, using an integrative approach, rumen flukes collected from slaughtered cows and sheep from the countryside of Jaguarão, Pelotas and Rio Grande, RS, between May and July of 2022. Recovered parasites were split by morphotypes, counted and fixed for morphological and molecular studies. For morphological analyses, amphistomes obtained from each city or host species were studied through different helminthologic techniques for this taxonomic group, including histological cuts, staining and mounting between glass slides and coverslips. The resulting histological cuts were observed through light microscopy, where morphological and morphometrical analyses were performed, alongside photographic records. Morphological identification was achieved through the use of taxonomic keys and descriptions available on previous literature. Molecular characterization evaluated parasite of different morphotypes, locations and hosts (n=11), consisting of DNA extraction, followed by PCR and sequencing of regions of the 28S rDNA nuclear gene, ITS-2 region and two regions of the *cox-1* mitochondrial gene (*barcode* and *post-barcode*). Resulting sequences were compared to data available on GenBank for members of the superfamily Paramphistomoidea and utilized on phylogenetical analyses. In total, 25 rumen samples containing parasites were collected, with a total of 2969 flukes being found on the internal wall of the organs. Two morphotypes of paramphistomes were identified. The first, which was present in all rumen samples, was identified as *Paramphistomum leydeni* Nasmark, 1937. Morphological studies allowed the observation of diagnostic characteristics of the species, such as tegumental papillae in rows concentrated on the anterior portion of the body and terminal genitalia of the leydeni type. Molecular studies of the ITS-2 marker revealed a 100% similarity with *P. leydeni* isolates from Argentina, China, Turkey and Uruguay. When it comes to the *cox-1* marker, the samples from Brazil diverged between 0.19-3.21% from European samples of *P. leydeni*, supporting the morphological identification. Beyond that, the *cox-1* phylogeny revealed a well-supported branch including Chinese samples of *P. leydeni*, but with higher divergence values (5.47-

6.23%). The second morphotype, identified as *Balanorchis anastrophus* Fiscoeder, 1901, was found in five ruminants (20%). Morphological identification was based on diagnostic characteristics of the Balanorchiidae Stunkard, 1925, which include long, branched papillae around the oral opening, extramural faringeal sacs, terminal genitalia forming a cirrus pouch in the pre-medial portion of the body, uterus and ovary pre-testicular and genital papillae absent. Topology of the phylogenetic trees obtained and the high genetic divergences observed for different molecular markers support the separation of the Balanorchiidae from other paramphistomids of ruminants. The present study confirms the occurrence of *P. leydeni* in Brazil through the use of molecular studies, in addition to presenting the first molecular sequences of this species from Brazil. Furthermore, the first molecular sequences of *B. anastrophus* were obtained and its phylogenetic position was evaluated for the first time.

Keywords: paramphistomidae; balanorchiidae; livestock; ruminants; taxonomy; trematodes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo biológico geral de trematódeos da família Paramphistomidae.....23
- Figura 2. Mapas do Brasil, com destaque para o estado do Rio Grande do Sul, e do Rio Grande do Sul, com destaque para a cidade de Pelotas..... 35
- Figura 3. Coleta de parasitos no rúmen de animais de produção em abatedouros de Pelotas, RS.
.....36
- Figura 4. Morfotipos de paramfístomos encontrados em rumens coletados 44
- Figura 5. *Paramphistomum leydeni*, forma adulta obtida do rúmen de bovino coletado em Pelotas, RS.....46
- Figura 6. *Balanorchis anastrophus*, forma adulta obtida do rúmen de bovino coletado em Pelotas, RS..... 51
- Figura 7. Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do marcador ribossomal 28S para as amostras de *Paramphistomum leydeni* e *Balanorchis anastrophus* e outras espécies de Paramphistomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank.....54
- Figura 8. Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região transcrita interna 2 para as amostras de *Paramphistomum leydeni* e *Balanorchis anastrophus* e outras espécies de Paramphistomoidea com sequências disponíveis no GenBank..... 55
- Figura 9. Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região maior do marcador mitocondrial *cox-1*, região pós-barcode (800 pb), para as amostras de

Paramphistomum leydeni e *Balanorchis anastrophus* e outras espécies de Paramphistomoidea com sequências disponíveis no GenBank.....56

Figura 10. Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do marcador mitocondrial cox-1, região pós-barcode (400 pb), para as amostras de *Paramphistomum leydeni* e *Balanorchis anastrophus* (em negrito) e outras espécies de Paramphistomoidea com sequências disponíveis no GenBank.57

Figura 11. Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do marcador mitocondrial cox-1, região barcode (600 pb), para as amostras de *Paramphistomum leydeni* e outras espécies de Paramphistomidae com sequências disponíveis no GenBank.58

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Espécies de Paramphistomoidea registradas em ruminantes na América do Sul.....26
- Tabela 2. Primers utilizados para amplificação e sequenciamento de genes ribossomais e mitocondriais dos parasitos encontrados no presente estudo40
- Tabela 3. Detalhes das coletas realizadas em dois abatedouros na cidade de Pelotas, RS.....43
- Tabela 4. Medidas obtidas de exemplares de *Paramphistomum leydeni* no presente estudo, em descrições prévias disponíveis e em registro prévio da espécie na região de Pelotas, RS47
- Tabela 5. Medidas obtidas de exemplares de *Balanorchis anastrophus* no presente estudo, em descrições prévias disponíveis e em registro prévio da espécie na região de Pelotas, RS52

LISTA DE ABREVIATURAS

28S rDNA: Subunidade maior do DNA ribossomal	RG: Rio Grande
BLAST: <i>Basic Alignment Search Tool</i>	RPM: Rotações por minuto
C: Comprimento	RS: Rio Grande do Sul
<i>cox-1</i> : Subunidade 1 da enzima citocromo oxidase	Seq: Sequenciamento
DNA: <i>Deoxyribonucleic acid</i>	SIM: Serviço de Inspeção Municipal
EDTA: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	SisGen: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
EUA: Estados Unidos da América	TAE: Tris-acetato-EDTA
F/R: <i>Forward / Reverse</i>	UV: Ultravioleta
Hab: Habitantes	
IB: Inferência Bayesiana	
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística	
IPEA: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada	
ITS: <i>Internal transcribed spacer</i>	
Jag.: Jaguarão	
L: Largura	
LTD: <i>Limited</i>	
MCMC: <i>Markov chain Monte Carlo</i>	
Morf.: Morfotipo	
MV: Máxima Verossimilhança	
n: Número	
NCBI: <i>National Center for Biotechnology Information</i>	
pb: Pares de base	
PCR: <i>Polymerase chain reaction</i>	
PEG: Polietilenoglicol	
Pel.: Pelotas	

Sumário

1. Introdução	18
2. Justificativa	32
3. Objetivos	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. Material e Métodos	34
4.1. Área de estudo	34
4.2. Obtenção e análise de rumens.....	35
4.3. Fixação dos parasitos	36
4.4. Estudos Morfológicos	37
4.5. Estudos Moleculares	38
4.5.1. Extração de DNA	38
4.5.2. Amplificação de DNA.....	38
4.5.3. Purificação dos produtos de PCR.....	41
4.5.4. Sequenciamento de DNA	41
4.5.5. Edição e análise das sequências	41
4.6. Aspectos éticos e legais	42
5. Resultados	43
5.1. Parasitos recuperados.....	43
5.2. Identificação taxonômica.....	45
5.2.1. Morfotipo I: <i>Paramphistomum leydeni</i> Nasmak, 1937.....	45
5.2.2 Morfotipo II: <i>Balanorchis anastrophus</i> Fiscoeder, 1901	50

6. Discussão	60
7. Conclusões	67
8. Referências	68

1. Introdução

O Brasil é um dos maiores produtores de gado de corte do mundo, sendo este o segundo maior produto de exportação do país, com um rebanho de mais de 224 milhões de cabeças de gado de acordo com a pesquisa da pecuária municipal de 2021 realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (Melo et al., 2023). De acordo com o levantamento feito pelo Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA) em fevereiro de 2023, o agronegócio brasileiro atingiu um superávit de US\$ 8,5 bilhões, compensando o déficit dos demais setores da economia. Isso consolida esse mercado como um dos principais pilares econômicos do país, sendo responsável por um considerável fluxo monetário entre os estados e no comércio de exportação. Essa importância engloba não apenas a produção de gado de corte, mas também produtos derivados, como lã e leite, servindo como uma base comercial para diversos estados que se especializam em diferentes ramos da produção animal (Tessele et al., 2013; Ortunho & Pinheiro, 2018).

Entre os estados que mais se destacam na atividade pecuária está o Rio Grande do Sul, conhecido pela produção de gado bovino de corte, onde o consumo interno e a exportação de carne são importantes para sua economia e cultura (Lampert et al., 2012; Dill et al., 2015). A importância desse comércio se reflete em aspectos culturais do estado, incluindo a culinária, muito conhecida pelo churrasco, e pontos turísticos baseados na história da pecuária regional. De fato, a diversidade de animais de produção consumidos, os inúmeros cortes de carne utilizados na culinária, a produção familiar de animais para abate e consumo, dentre outros aspectos, revelam a importância da pecuária no estado gaúcho (Laske et al., 2012).

O desenvolvimento da pecuária no estado do Rio Grande do Sul é favorecido pela presença do pampa como principal bioma, uma vez que suas planícies são amplamente utilizadas para pastagem. De acordo com o censo agropecuário de 2017 realizado pelo IBGE, existem mais de 365 mil estabelecimentos agropecuários ao longo do estado, se estendendo por uma área de 21,7 milhões de hectares. Esse cenário pode ser visualizado ao longo das estradas que percorrem o estado, com fazendas, plantações e rebanhos cobrindo os campos que circundam as cidades (Carvalho et al., 2009). Ademais, a proximidade do estado com a Argentina e Uruguai, países vizinhos que também apresentam aspectos socioeconômicos voltados para a produção agropecuária, facilitam a difusão desse comércio e uma troca e manutenção dos costumes regionais.

Com a relevância e influência da pecuária no comércio brasileiro, são crescentes os estudos focando no conhecimento de fatores que podem levar a perdas de produção. Um dos problemas de grande impacto nesse mercado são as helmintoses que podem acometer os animais, prejudicando seu bem-estar, absorção de nutrientes, desenvolvimento e, conseqüentemente, menor produção de carne, leite e produtos derivados (Tessele et al., 2013; Sargison et al., 2016). Entre os diferentes helmintos parasitos de ruminantes com importância veterinária no Brasil, destacam-se espécies de nematódeos pertencentes aos gêneros *Cooperia* Ransom, 1907, *Haemonchus* Cobb, 1898 e *Trichostrongylus* Looss, 1905, parasitos do intestino delgado e abomaso, e os cestódeos *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) e *Taenia saginata* (Goeze, 1782), parasitos de vísceras e músculos, respectivamente. Entre os trematódeos, merecem destaque *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892) e diversas espécies da família Paramphistomidae Fiscoeder, 1901, parasitos do fígado, pâncreas e câmaras digestivas, respectivamente (Mattos & Ueno, 1996; Tessele et al., 2013; Ramos et al., 2016; Ortunho & Pinheiro, 2018).

Entre os ruminantes de produção, as vacas (*Bos taurus* Linnaeus, 1758) e as ovelhas (*Ovis aries* Linnaeus, 1758) são as espécies mais amplamente difundidas ao redor do mundo e mesmo no Brasil. Esses animais são nativos da Eurásia e a sua domesticação é datada de 10 mil anos atrás, a partir de seus ancestrais *Bos primigenius* Bojanus, 1827 e *Ovis orientalis* Blyth, 1841, durante o neolítico (Mctavish et al., 2013; Alberto et al., 2018). O número de eventos de domesticação dessas espécies ainda é debatido, mas é amplamente aceito que ocorreram diversos ao longo da história, em diferentes continentes, resultando na seleção de espécies e raças distribuídas pelo globo atualmente (Stock & Gifford-Gonzalez, 2013; Pitt et al., 2019).

No Brasil, é sabido que os primeiros animais foram trazidos da Europa pouco tempo após o descobrimento, com o início da atividade pecuária no país sendo datada do século XVI, na terceira década após a colonização. Essa introdução ocorreu no Nordeste do país, sendo expandida até a região Sul pelas missões jesuítas (Teixeira & Hespanhol, 2014). A introdução e dispersão desses animais pelo mundo trouxe consigo a possibilidade de introdução de seus helmintos em regiões onde hospedeiros adequados ao seu ciclo biológico estejam presentes (Britton, 2013; Thompson, 2013). Esse processo é ainda mais complexo quando se considera um evento de “*spillover*”, em que os parasitos de animais introduzidos passam a infectar animais silvestres e vice-versa (Utaaker et al., 2023).

Essa troca de parasitos entre hospedeiros pode prejudicar tanto ruminantes locais,

quanto rebanhos introduzidos. A prática de pecuária é notória pela transformação do habitat para pastagem, o que afasta animais nativos de regiões previamente ocupadas. Quando ela se soma à possibilidade de introdução de novas infecções para um ambiente já fragilizado, as consequências podem ser preocupantes para diferentes espécies. Quando o cenário se inverte, a introdução de novos parasitos aos rebanhos pode prejudicar a produção animal ao expor os ruminantes a infecções para as quais eles não estão adaptados, o que pode causar doenças inesperadas e de difícil diagnóstico (Landaeta-Aqueveque et al., 2014; Utaaker et al., 2023).

Devido às perdas econômicas decorrentes das helmintoses que acometem ruminantes, métodos de controle vêm sendo explorados em diferentes partes do mundo a fim de levar a uma redução no número de casos e uma consequente diminuição das perdas no setor agropecuário (Morley & Donald, 1980; Cabaret et al., 2002a; Hamid et al., 2023). O uso de anti-helmínticos tem sido um grande aliado no combate às parasitoses veterinárias ao longo dos anos, mas o uso indiscriminado dos medicamentos vem gerando casos de resistência dos parasitos. Isso ocorre devido à subdosagem de medicamentos como Ivermectina e Albendazol, amplamente utilizados no combate a nematódeos parasitos de ruminantes, além de seu uso indiscriminado devido à facilidade de acesso à medicamentos comercializados. Esse cenário de ampla utilização de forma inadequada permite que populações mais resistentes de parasitos sejam selecionadas nos rebanhos, ocasionando uma perda de eficácia dos anti-helmínticos previamente caracterizados como eficazes (Jackson & Coop, 2000; Sutherland & Leathwick, 2011). De fato, no país, existem registros de resistência a anti-helmínticos em espécies de nematódeos tricostrongilídeos parasitos de bovinos (Borges et al., 2013; Ramos et al., 2016; Salgado & Santos, 2016; Oliveira et al., 2017). No caso de trematódeos, estudos realizados em rebanhos do Paraná relatam a ineficácia de triclabendazol no controle de *F. hepatica* (Oliveira et al., 2008). Entretanto, a escassez de relatos pode estar relacionada a um menor incentivo à pesquisa das demais parasitoses que afetam a região Sul do Brasil.

Outra abordagem para o controle de infecções helmínticas é o manejo dos rebanhos de forma a controlar a presença de parasitos com metodologias que não envolvem o uso de drogas. Isso é muito comum na produção orgânica, onde o uso de medicamentos é limitado e estratégias alternativas são empregadas (Barger, 1997; Cabaret et al., 2002b). Elas incluem: estratégias preventivas, utilizando pastagens e animais livres de parasitos para prevenir a presença de parasitos; Evasivas, focadas no isolamento de indivíduos infectados para evitar a dispersão dos parasitos; e de diluição, que envolvem o cruzamento com indivíduos resistentes a parasitoses,

redução do período de pastagem e do número de animais no rebanho, permitindo um melhor controle. Outros pontos também recebem atenção e complementam as estratégias previamente mencionadas, como o fornecimento de água filtrada e alimentos de origem conhecida, além da criação dos animais em ambientes cercados, reduzindo sua exposição à agentes infecciosos presentes no ambiente (Cabaret et al., 2002a).

Entre as doenças causadas por helmintos que infectam ruminantes, a paramfistomose pode ser considerada uma das menos estudadas em nosso meio (Huson et al., 2017). Essa parasitose se destaca por sua ampla distribuição mundial, afetando diversas espécies de animais, incluindo bovinos, caprinos, ovinos, bubalinos e ruminantes silvestres (Mirza et al., 2009; Godara et al., 2014; Huson et al., 2017; Wiedermann et al., 2021). Os agentes etiológicos dessa doença estão atualmente incluídos na ordem Plagiorchiida La Rue, 1957, na superfamília Paramphistomoidea Fiscoeder, 1901, sendo a maioria dos agentes que infectam ruminantes incluídos na família Paramphistomidae. Nessa, diferentes gêneros como *Calicophoron* Nasmark, 1937, *Cotylophoron* Stiles & Goldberger, 1910, *Gigantocotyle* Näsmark, 1937 e *Paramphistomum* Fiscoeder, 1901 se destacam por apresentarem espécies de importância econômica e veterinária (Eduardo, 1982, 1986; Sey, 1991; Sanabria & Romero, 2008; Huson et al., 2017). Contudo, existem algumas outras espécies de Paramphistomoidea, atualmente incluídas em Balanorchiidae Stunkard, 1925 e Zygoctylidae Ward, 1917, relatadas em ruminantes de produção, principalmente em bovinos (Amato et al., 1982; Baptista-Farias et al., 1992; Nascimento et al., 2006).

O parasitismo por paranfístomos tem sido associado a perdas de produtividade e ocasionais mortes. As alterações patológicas decorrentes da infecção causam maiores impactos em indivíduos jovens, acarretando num menor ganho de peso, produção de leite e qualidade da lã (no caso de ovinos) ao longo do desenvolvimento do animal. A presença de um grande número de parasitos é o principal fator associado à morte de juvenis infectados, devido à sua imunidade pouco desenvolvida e à falta de exposições prévias a parasitos (Sanabria & Romero, 2008; Sargison et al., 2016). Embora ruminantes adultos costumem desenvolver infecções assintomáticas, essas podem se agravar em casos de subnutrição, idade avançada e saúde comprometida (Sanabria & Romero, 2008; Huson et al., 2017). A patogenia envolve a movimentação e ascensão dos paranfístomos imaturos pelo trato gastrointestinal. Esse processo se dá pela sucção da mucosa, tração do corpo e liberação do acetábulo, levando a uma série de lesões ao longo do trato digestório do animal. Essas lesões ocasionam processos inflamatórios

e má absorção de nutrientes, podendo desencadear sintomas como diarreia, perda de peso e anorexia, dependendo do número de parasitos presentes (Hotessa & Kanko, 2020).

Tendo em vista a presença de paranfístomos como potencial agente patogênico em ruminantes de produção, a compreensão dos ciclos biológicos desses parasitos é de suma importância para direcionar medidas de controle. Dois hospedeiros, um molusco límnico e um vertebrado, geralmente um ruminante, estão envolvidos na complexa cadeia de transmissão desses helmintos. O ciclo biológico desses parasitos (Figura 1) se inicia pela liberação de ovos no ambiente aquático junto das fezes do hospedeiro vertebrado, seu amadurecimento no ambiente e, após cerca de duas semanas, a emergência de miracídios ciliados e livre-natantes. Esses estágios vão de encontro a gastrópodes *Lymnaeidae* Rafinesque, 1815 e *Planorbidae* Rafinesque, 1815 (dependendo da espécie de parasito), penetrando em seu tegumento. Dentro desses hospedeiros intermediários ocorre a fase de reprodução assexuada do ciclo, na qual são originados esporocistos, os quais geram rédias. Estas se alimentam dos tecidos do molusco e produzem cercárias, que são do tipo anfistoma. Após a emergência do molusco, as cercárias nadam de encontro à vegetação ou outro tipo de substrato sólido, na qual se encistam na forma de metacercárias. Essas por sua vez, são ingeridas pelos ruminantes no momento do repasto, se desencistando ao atingirem o intestino delgado e alimentando-se até atingirem a maturação. Em seguida, os parasitos migram até o rúmen, onde se fixam e se tornam adultos, se alimentando de líquido ruminal e realizando a reprodução sexuada do ciclo, quando produzem ovos que são liberados nas fezes do hospedeiro (Dinnik & Dinnik, 1954; Sey, 1991; Huson et al., 2017; Hotessa & Kanko, 2020).

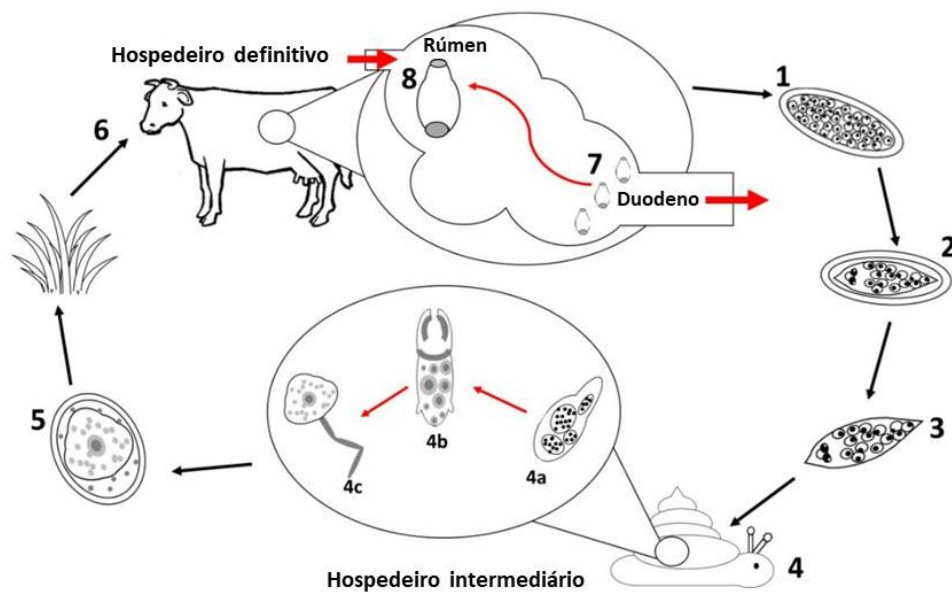


Figura 1. Ciclo biológico geral de trematódeos da família Paramphistomidae: 1) Ovo imaturo liberado nas fezes do hospedeiro vertebrado; 2) Miracídio é formado no ovo; 3) Miracídio eclode do ovo; 4) Miracídio penetra em um gastrópode límnico que atua como hospedeiro intermediário, com a formação de: 4^a) Esporocisto; 4^b) Rédia; 4^c) Cercária; 5) Cercárias nadam e se encistam na vegetação como metacercárias; 6) Ruminante ingere a vegetação contendo metacercárias; 7) Metacercárias se desencistam no intestino e dão origem a formas juvenis; 8) Juvenis ascendem o trato digestório até o rúmen, onde se tornam adultos e geram ovos, os quais são liberados no ambiente (modificado de Huson et al., 2017).

Diversos fatores ambientais facilitam a manutenção de ciclos biológicos de paramfístomos e, conseqüentemente, a infecção de um rebanho. A presença de um corpo d'água ao qual os ruminantes tenham acesso e a presença de moluscos adequados à infecção são pontos importantes nesse contexto. Além disso, a ocorrência de períodos quentes estimula a reprodução dos moluscos hospedeiros, possibilitando uma maior taxa de infecção pelos parasitos e um aumento no número de herbívoros infectados (Veitenheimer-Mendes & Almeida-Caon, 1989). Por último, a criação de rebanhos em grandes campos, com baixa supervisão, facilita que esses animais se infectem e mantenham o ciclo do parasito naquele ambiente, especialmente em casos subclínicos ou assintomáticos (Sanabria & Romero, 2008; Laske et al., 2012). O estado do Rio Grande do Sul se enquadra nesse cenário, havendo criação de gado solto ou em extensas áreas

cercadas ao longo de uma ampla porção de seu território, com diversos animais apresentando contato frequente com corpos d'água que servem de hábitat para moluscos.

O conhecimento sobre a existência de paranfístomos no Brasil é datado do início do século XIX, quando o naturalista austríaco Johann Natterer realizou uma expedição científica ao país e coletou milhares de vertebrados para enviá-los ao Museu de História Natural de Vienna. Natterer também fixou diversos parasitos presente no trato digestório dos animais examinados, criando um acervo contendo diversos grupos de trematódeos que vieram a ser melhor descritos nos anos seguintes (Sattmann et al., 2000). Dentre esses, os paranfístomos aqui coletados viriam a ser caracterizados taxonomicamente na década de 1900 por Franciszek Fischoeder, pesquisador polonês que descreveu diversas espécies de anfishomídeos encontrados nas Américas parasitando ruminantes silvestres. Essas amostras estão depositadas em museus de Viena e também de Berlim e integraram extensos estudos publicados em 1901 e 1903 pelo autor. Nesses estudos ele sugere a classificação dos Paramphistomidae como uma família, além de descrever nove espécies de *Paramphistomum* e o gênero *Balanorchis* Fischoeder, 1901, com a espécie *B. anastrophus*. No total, o pesquisador contribuiu com a classificação e redescritção de mais de 15 espécies de Paramphistomoidea, se tornando uma importante referência para o grupo.

Posteriormente, grandes helmintologistas brasileiros, como Lauro Travassos e Vernon Thatcher, realizaram importantes contribuições para o conhecimento da taxonomia destes parasitos existentes em diferentes grupos de vertebrados (especialmente peixes e anfíbios) no país (Travassos, 1928). Atualmente no Brasil, 14 espécies de Paramphistomoidea foram reportadas infectando diferentes espécies de ruminantes, incluindo bovinos, caprinos, ovinos e cervídeos (revisado por Fernandes et al., 2015) (Tabela 1). As espécies de parasitos de animais de produção identificadas pertencem a quatro gêneros: *Balanorchis*, *Cotylophoron*, *Paramphistomum* e *Zygocotyle* Stunkard, 1916, os quais foram relatados principalmente em estados da região sul do país (Amato et al., 1982), mas também com registros no estado do Pará (Miranda & Costa, 1999; Amaral et al., 2020).

Apesar do número significativo de espécies registradas e do parasitismo em vertebrados não ser incomum, aspectos do ciclo biológico desses parasitos permanecem praticamente desconhecidos no Brasil. De fato, o número de registros de larvas desses trematódeos no país é escasso, existindo em torno de três registros de moluscos infectados com larvas identificadas por abordagem morfológica como *Paramphistomum* sp. (revisado por Pinto & Melo 2013).

Estes registros, realizados entre as décadas de 1980 e 1990, são baseados no encontro de cercárias do tipo anfístoma em moluscos planorbídeos, *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) e *Drepanotrema kermatoides* (d'Orbigny, 1835), ambos no estado do Rio Grande do Sul (Santos et al., 1986; Veitenheimer-Mendes & Almeida-Caon, 1989; Müller et al., 1992). Mais recentemente, estudos sobre o ciclo biológico de *Zygocotyle lunata* (Diesing, 1836) (Barbosa et al., 2011) e *Catadiscus marinholutzi* Freitas & Lent, 1939 (Queiroz et al., 2021), foram realizados no país a partir de infecções experimentais e/ou análises moleculares iniciadas a partir de estágios larvais encontrados em moluscos planorbídeos.

Tabela 1. Espécies de Paramphistomoidea registradas em ruminantes na América do Sul.

Espécie	Localidade	Hospedeiro	Referência
Balanorchiidae			
<i>Balanorchis anastrophus</i> Fiscoeder, 1901	Argentina	Bovino	Fernandes et al., 2015*
	Brasil	<i>Blastocerus dichotomus</i> (Illiger, 1815)	Fernandes et al., 2015*
		Bovino	Fernandes et al., 2015*
	Paraguai	Bovino	Sey, 1991*
	Uruguai	Bovino	Sey, 1991*
	Venezuela	<i>Odocoileus virginianus gymnotis</i> (Wiegmann, 1833)	Fernandes et al., 2015*
Paramphistomidae			
<i>Cotylophoron bareilliensis</i> Mukherjee & Chauhan, 1965	Brasil	<i>Bos taurus indicus</i> Linnaeus, 1758	Fernandes et al., 2015*
		<i>Capra hircus</i> Linnaeus, 1758	Fernandes et al., 2015*
		<i>Ovis aries</i> Linnaeus, 1758	Fernandes et al., 2015*
<i>Cotylophoron cotylophorum</i> (Fiscoeder, 1901)	Argentina	Bovino	Fernandes et al., 2015*
		Ovino	Fernandes et al., 2015*
	Brasil	Ovino	Fernandes et al., 2015*
	Chile	<i>Bos taurus</i>	Fernandes et al., 2015*
	Colômbia	<i>Bos taurus</i>	Fernandes et al., 2015*
	Peru	Bovino	Fernandes et al., 2015*

Tabela 1. Continuação

	Venezuela	<i>Bos taurus</i>	Fernandes et al., 2015*
<i>Cotylophoron fülleborni</i> Nasmark, 1937	Brasil	<i>Bos taurus indicus</i>	Fernandes et al., 2015*
<i>Cotylophoron jacksoni</i> Nasmark, 1937	Brasil	<i>Bos taurus indicus</i>	Fernandes et al., 2015*
		<i>Capra hircus</i>	Fernandes et al., 2015*
<i>Cotylophoron marajoensis</i> Amaral et al., 2020	Brasil	<i>Bubalus bubalis</i> Linnaeus, 1758	Amaral et al., 2020
<i>Cotylophoron panamensis</i> Price & McIntosh, 1953	Brasil	<i>Bos taurus</i>	Fernandes et al., 2015*
	Colômbia	<i>Bos taurus indicus</i>	Fernandes et al., 2015*
<i>Cotylophoron travassosi</i> Costa & Guimarães, 1992	Brasil	<i>Bos taurus indicus</i>	Fernandes et al., 2015*
		<i>Capra hircus</i>	Fernandes et al., 2015*
		<i>Ovis aries</i>	Fernandes et al., 2015*
<i>Cotylophoron</i> sp.	Peru	Bovino	Rojas et al., 2015
<i>Paramphistomum cervi</i> Fiscoeder, 1901	Argentina	<i>Ozotoceros bezoarticus celer</i> Cabrera, 1943	Fernandes et al., 2015*
	Brasil	<i>Blastocerus dichotomus</i>	Fernandes et al., 2015*
		<i>Bos taurus</i>	Fernandes et al., 2015*
		<i>Bos taurus indicus</i>	Fernandes et al., 2015*
		Bovino	Fernandes et al., 2015*
	Peru	<i>Bos taurus</i>	Fernandes et al., 2015*
	Uruguai	<i>Gado</i>	Fernandes et al., 2015*
	Venezuela	<i>Bos taurus</i>	Fernandes et al., 2015*

Tabela 1. Continuação

<i>Paramphistomum gracile</i> Fiscoeder, 1901	Brasil	<i>Bos taurus</i>	Fernandes et al., 2015*
		<i>Bos taurus indicus</i>	Fernandes et al., 2015*
<i>Paramphistomum ichikawai</i> Fukui, 1922	Brasil	Gado	Fernandes et al., 2015*
	Uruguai	Gado	Fernandes et al., 2015*
<i>Paramphistomum leydeni</i> Nasmark, 1937	Argentina	<i>Bos taurus</i>	Fernandes et al., 2015*
	Brasil	<i>Bos taurus</i>	Fernandes et al., 2015*
	Colômbia	<i>Bos taurus</i>	Fernandes et al., 2015*
	Venezuela	<i>Bos taurus</i>	Fernandes et al., 2015*
<i>Paramphistomum liorchis</i> Fiscoeder, 1901	Brasil	<i>Blastocerus dichotomus</i>	Fernandes et al., 2015*
		<i>Mazama americana</i> (Erxleben, 1777)	Fernandes et al., 2015*
		<i>Mazama rufina</i> Bourcier & Pucheran, 1852	Fernandes et al., 2015*
		<i>Mazama gouazoubira</i> (Fischer, 1814)	Fernandes et al., 2015*
		<i>Odocoileus cariacou cariacou</i> (Boddaert, 1784)	Fernandes et al., 2015*
		<i>Ozotoceros bezoarticus</i> (Linnaeus, 1758)	Fernandes et al., 2015*
<i>Paramphistomum</i> sp.	Colômbia	Bovino	Pinilla et al., 2019a
<i>Paramphistomum</i> sp.	Colômbia	Bovino	Pinilla et al., 2018a
<i>Paramphistomum</i> sp.	Colômbia	Bovino	Pinilla et al., 2018b
<i>Paramphistomum</i> spp.	Colômbia	Bovino e ovino	Pinilla et al., 2019b
		Ovino	Pinilla et al., 2019b

Paramphistomidae	Colômbia	Bovino	Arroyo et al., 2022
Zygocotylidae			
<i>Zygocotyle lunata</i> (Diesing, 1836)	Brasil	<i>Blastocerus dichotomus</i>	Fernandes et al., 2015*
		<i>Bos taurus</i>	Fernandes et al., 2015*

*Trabalho compilando registros prévios na América do Sul

A despeito da importância da pecuária para a região Sul do país e da paramphistomose ser uma importante helmintose que acomete ruminantes de produção (Velázquez-Maldonado, 1976; Mattos & Ueno, 1996), estudos são ainda necessários para uma melhor compreensão da taxonomia e biologia desses helmintos. Tais informações podem direcionar medidas de controle das infecções e uma redução nas perdas econômicas decorrentes das infecções. Na região Sul do Rio Grande do Sul, um levantamento de paramphistomos parasitos de bovinos realizado por Velázquez-Maldonado (1976) registrou a presença de nove espécies desses trematódeos parasitando o rúmen de animais provenientes de cinco cidades da região. Entre 522 bovinos analisados, 52 eram provenientes da cidade de Pelotas, dos quais 11 encontravam-se infectados por paramphistomos. Sete espécies pertencentes a *Paramphistomum* (*P. gracile* Fischöder, 1901, *P. ichikawai* Fukui, 1922, *P. gotoi* Fukui 1926, *P. leydeni* Näsmarck, 1937, *P. hiberniae* Willmott, 1950, *P. julimarinorum* Velázquez-Maldonado, 1976 e *P. nicabrasilorum* Velázquez-Maldonado, 1976) foram caracterizadas por esse autor. Apesar da importância desse registro para a compreensão da biologia e impacto desses parasitos no estado, a real existência dessa diversidade de espécies ainda precisa ser corroborada através de dados moleculares. Contudo, esse tipo de informação é ainda inexistente para essa região altamente afetada pela paramphistomose.

O uso de taxonomia integrativa, aliando estudos morfológicos e moleculares, tem se mostrado efetivo na identificação e classificação taxonômica de trematódeos (Olson & Tkach, 2005; Blasco-Costa et al., 2016). A despeito de sua reconhecida importância econômica para o setor pecuário, estudos filogenéticos focados em paramphistomos parasitos de ruminantes ainda são inexistentes para o Brasil. Ademais, a diversidade de sequências moleculares disponíveis para comparação ainda é baixa, sendo grande parte advinda de estudos realizados em países do Velho Mundo (Martinez-Ibeas et al., 2016; Sindičić et al., 2017; Rafiq et al., 2020; Khan et al., 2020; Padak & Karakuş, 2021), com poucas referências para países das Américas (Sanabria et al., 2011; Amaral et al., 2020). Na Argentina, Sanabria et al. (2011) obtiveram sequências do marcador ribossomal ITS-2 de *P. leydeni* coletado em ruminantes. No Brasil, Amaral et al. (2020) descreveram a espécie *Cotylophoron marajoensis* Amaral et al., 2020 parasitando bubalinos no estado do Pará, além de obterem sequências moleculares para o marcador ribossomal 18S.

Outro ponto importante é a disparidade no número de marcadores moleculares sequenciados para Paramphistomoidea, sendo determinados fragmentos do DNA ribossomal,

especialmente o espaçador interno transcrito 2 (ITS-2), frequentemente utilizados para estudos visando a identificação específica de indivíduos (Lotfy et al., 2010; Sanabria et al., 2011; Martinez-Ibeas et al., 2016; Sindićić et al., 2017; Jadav et al., 2018; Mitchell et al., 2021; Wiedermann et al., 2021). Contudo, esse marcador não fornece informações robustas quando o foco é a compreensão das relações evolutivas entre as espécies da superfamília e proposição de uma classificação filogenética (Laidemitt et al., 2017). Para essa última abordagem, faltam ainda dados genéticos para os Paramphistomoidea parasitos de ruminantes descritos do Brasil. Essas questões evidenciam a potencial contribuição da geração de informações moleculares, por diferentes marcadores genéticos, para corroborar as identificações morfológicas previamente realizadas, bem como contextualizá-las no cenário de classificação filogenética robusto necessário para o avanço no conhecimento sobre este importante grupo de helmintos.

2. Justificativa

Tendo em vista a importância econômica da pecuária para o Brasil, especialmente quando se trata da região Sul do país, são necessários maiores estudos visando compreender como diferentes aspectos podem afetar esse mercado. As infecções helmínticas em ruminantes são um problema recorrente no estado do Rio Grande do Sul devido à ênfase dada à criação de gado de corte e às perdas de produtos decorrente das parasitoses. Dentre essas doenças, as infecções por trematódeos são responsáveis por extensas perdas econômicas no mercado pecuário, sendo capazes de afetarem diferentes órgãos de animais de produção e prejudicarem tanto seu desenvolvimento, quanto sua produção de produtos secundários, como lã e leite. Embora sejam feitos esforços para uma melhor compreensão do impacto desses parasitos no ambiente e na pecuária, ainda existem diversas lacunas no estudo dos trematódeos que infectam animais de produção. Os paranfístomos são um grupo de trematódeos que utilizam caramujos de água doce e ruminantes como hospedeiros em seus ciclos, sendo a infecção aguda associada a prejuízos no desenvolvimento de mamíferos jovens e até mesmo à morte devido a altas cargas parasitárias. Apesar de seu ciclo biológico impactar diretamente a produção de gado e do Rio Grande do Sul apresentar um sistema pecuário onde ruminantes podem ser facilmente expostos à infecção em fazendas, ainda existem poucos estudos visando uma melhor compreensão do cenário da paranfistomose na região. Tendo isso em mente, trabalhos objetivando a identificação das espécies presentes infectando rebanhos no estado, sua descrição morfológica e estudos filogenéticos podem contribuir para um melhor entendimento de como esses parasitos vêm impactando o ambiente e a pecuária regional e subsidiar medidas de controle.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Caracterizar por abordagem morfológica e molecular trematódeos encontrados no rúmen de animais de produção abatidos na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a presença de trematódeos no rúmen de animais de produção oriundos na região de Pelotas e entorno.
2. Realizar a caracterização morfológica dos parasitos obtidos visando a identificação taxonômica.
3. Realizar a caracterização molecular (PCR, sequenciamento e análises filogenéticas) dos helmintos encontrados para o avanço na identificação taxonômica.
4. Avaliar a posição filogenéticas das espécies encontradas e validar a classificação taxonômica atualmente utilizada para o grupo.

4. Material e métodos

4.1. Área de estudo

O estudo foi realizado na cidade de Pelotas, estado do Rio Grande do Sul, município que abriga mais de 300 mil habitantes, sendo a 4ª maior cidade do estado segundo o censo sociodemográfico do IBGE de 2022. A cidade possui uma área de 1.608 km², com uma densidade populacional de 201,4 hab/km², incluindo uma extensa área rural que a conecta com diversas cidades vizinhas. A cidade foi fundada em 1758, tendo sua história muito associada às charqueadas, as quais são áreas rurais responsáveis pela produção de carne salgada e seca ao sol. A primeira charqueada da cidade foi fundada em 1780, sendo responsável por um grande influxo populacional devido à expansão do mercado na região e atrelando a criação da cidade à produção de gado, onde as charqueadas seguem sendo um ponto turístico até os dias recentes.

Os arredores de Pelotas são amplamente utilizados para a criação de gado, especialmente bovino, sendo um cenário facilmente observado nas estradas que ligam as cidades do estado, as quais são cercadas por fazendas focadas em pecuária. Somado a isso, a cidade conta com diversos abatedouros que recebem animais para abate e processamento das carcaças, com muitos se especializando no abate de ruminantes ou de suínos, além de serem adaptados para rebanhos de diferentes tamanhos. Esse processo envolve etapas como o sacrifício do animal, separação das vísceras, repartição da carcaça, análise das porções para procura de infecções e doenças que sejam de relato obrigatório para órgãos de inspeção e envio do produto obtido para comercialização. O mercado frigorífico da cidade recebe animais criados na região e também de cidades vizinhas, onde lotes de diferentes fazendas são enviados diariamente para abate e inspeção. Atualmente, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) exige a notificação obrigatória de diversas doenças de ruminantes após o abate, incluindo brucelose, febre aftosa e tripanossomose.

A partir disso, o presente estudo avaliou a presença de parasitos em rumens de bovinos e ovinos abatidos na cidade de Pelotas, RS (Figura 2), entre os meses de maio e julho de 2022. Para isso, foi feita uma avaliação dos órgãos durante o processamento da carcaça, visando a obtenção de parasitos ainda vivos.

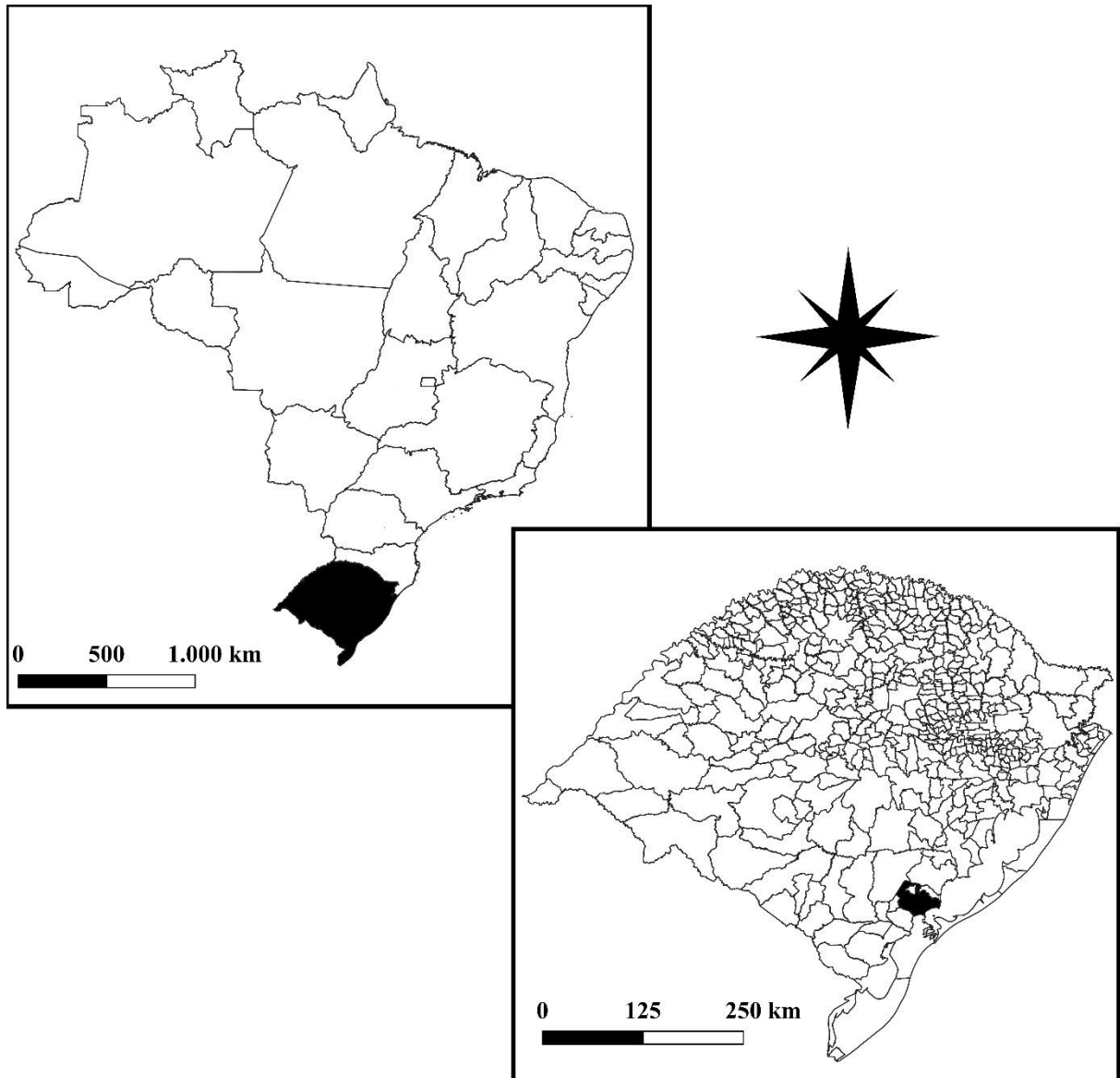


Figura 2. Mapas do Brasil, com destaque para o estado do Rio Grande do Sul, e do Rio Grande do Sul, com destaque para a cidade de Pelotas.

4.2. Obtenção e análise de rumens

Foram feitas visitas a dois abatedouros localizados em Pelotas, onde rumens de animais abatidos no dia foram avaliados. As coletas foram realizadas sob a supervisão do veterinário responsável pelo abatedouro e com o auxílio dos funcionários responsáveis pela seção designada para a avaliação do trato gastrointestinal do gado abatido. Após a chegada do rúmen para processamento, ele foi aberto, submetido à lavagem com água a 45 °C para a retirada do conteúdo estomacal e suspenso em ganchos de metal, momento no qual foi feita a verificação

da presença de paranfístomos adultos na parede interna do órgão. As porções visivelmente infectadas dos rumens foram separadas com o auxílio de uma faca, embaladas em sacos plásticos identificados por hospedeiro e levadas para laboratório. Os tecidos coletados foram triados com o auxílio de um pincel e bisturi para a remoção dos parasitos adultos, os quais foram separados por morfotipo, contabilizados e fixados para análises morfológicas e moleculares (Figura 3).

4.3. Fixação dos parasitos

Para análises morfológicas, os parasitos coletados foram colocados em tubos falcon, mortos em água a 80 °C e fixados em formol 10% para posteriores estudos morfológicos. Para análises moleculares, os parasitos foram colocados em tubos Eppendorf e fixados em álcool etílico 95%, sendo posteriormente acondicionados em freezer a -20 °C até o momento da análise.



Figura 3. Coleta de parasitos no rúmen de animais de produção em abatedouros de Pelotas, RS. (A) Trato digestório de ruminante pré-processamento. (B) Avaliação do rúmen após limpeza do órgão. (C) Rúmen contendo paranfístomos em sua parede interna. (D) Amostra de rúmen parasitado coletado para análise. (E) Paranfístomos removidos de tecido parasitado.

4.4. Estudos morfológicos

As análises morfológicas consistiram em estudos de estruturas diagnósticas dos diferentes morfotipos de parasitos encontrados e estudos morfométricos analisando as medidas dessas estruturas para posterior comparação com descrições prévias. Devido à espessura do corpo dos indivíduos adultos, foram realizados cortes histológicos e manuais dos mesmos, de acordo com a metodologia padronizada para este grupo de trematódeos (Jones, 1990). Para os cortes histológicos, os vermes mais espessos previamente fixados foram desidratados em uma série crescente de etanol (70°, 80°, 90° e 99,8°) e incluídos em parafina. Em seguida, foram seccionados em cortes frontais ou sagitais utilizando um micrótomo para a obtenção de secções de 8 micrômetros de espessura. A coloração das lâminas histológicas foi feita com hematoxilina e eosina, sendo seguida de desidratação em etanol, clarificação em creosoto de Faia e montagem entre lâmina e lamínula em bálsamo do Canadá.

Os cortes manuais dos parasitos maiores consistiram em seu posicionamento entre duas lâminas para seu apoio, seguido do seccionamento de seu corpo em uma série de frações utilizando uma lâmina de barbear. Os cortes resultantes foram corados utilizando carmin aceto-alumen, também sendo desidratados em etanol, clarificados em creosoto de Faia e montados entre lâmina e lamínula em bálsamo do Canadá.

No caso de parasitos menores, devido a dificuldades na obtenção de cortes histológicos, foi realizada sua prensagem utilizando placas de vidro, entre as quais os trematódeos foram colocados em contato com formol 10% para evitar sua desidratação, permitindo que estruturas diagnósticas fossem observadas mesmo com a robustez do tegumento. Em seguida, foram corados por imersão em solução carmin aceto-alumen e submetidos à desidratação e clarificação, sendo montados entre lâmina e lamínula, como previamente descrito.

As lâminas obtidas dos parasitos foram analisadas em microscópio de luz para observação de estruturas diagnósticas. Além disso, quando necessário, medidas foram obtidas com o auxílio de oculares micrometradas. Fotografias dos trematódeos seccionados foram obtidas utilizando uma câmera digital *LEICA ICC50 HD*® acoplada a um microscópio de mesma marca, sendo as imagens capturadas posteriormente analisadas pelo *software Leica Application Suite*® (*LAZEZ*) Versão 2.0. Imagens dos vermes inteiros fixados em formol foram obtidas utilizando um estereomicroscópio e uma câmera digital para o registro da morfologia externa e de estruturas diferenciais. A identificação taxonômica dos trematódeos encontrados foi baseada em critérios morfológicos de acordo com trabalhos de referência sobre o grupo

(Eduardo, 1982, 1986; Sey, 1991; Jones, 2005; Fernandes et al., 2015), além da comparação das medidas e características observadas em espécies semelhantes descritas na literatura.

4.5. Estudos moleculares

4.5.1. Extração de DNA

As amostras selecionadas para estudo molecular foram lavadas três vezes com 200 µL de água destilada para a remoção do álcool etílico. A extração do DNA das amostras foi feita utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do DNA extraído foi determinada por um espectrofotômetro de microvolume *NanoDrop® Lite* (Thermo Scientific, EUA), utilizando a relação de absorvância entre 260 nm. Para a determinação da pureza do DNA das amostras, determinou-se a relação das absorvâncias obtidas nos comprimentos de onda 260 e 280 nm.

4.5.2. Amplificação de DNA

Foram feitas tentativas de amplificação de diferentes genes do DNA ribossomal e mitocondrial amplamente estudados e utilizados na identificação de trematódeos digenéticos. Para a seleção das regiões adequadas para amplificação, foi feito um levantamento da literatura especializada em biologia molecular sobre os parasitos encontrados, visando avaliar os marcadores utilizados e as sequências disponíveis para posterior comparação.

Foram selecionados quatro marcadores moleculares frequentemente utilizados em estudos de trematódeos. Para o DNA ribossomal, foram consideradas as regiões ITS-2 e a sequência parcial da subunidade maior (28S, região V1-V3). Para o DNA mitocondrial, foram utilizados fragmentos da subunidade I da proteína citocromo oxidase (*cox-1*), região *Barcode* e pós-*Barcode*. Os iniciadores utilizados são apresentados na Tabela 2, assim como as condições utilizadas na reação em cadeia da polimerase (PCR).

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 µL, o qual incluiu 2,5 µL de solução de DNA obtida da extração na concentração de 25-50 ng, 12,5 µL de solução do mix *GoTaq Green Master Mix®* (Promega, EUA) ou *Platinum Taq Polymerase®* (Invitrogen, EUA), 8,75 µL de água ultrapura e 1,25 µL do mix de oligonucleotídeos iniciadores (0,625 de cada primer específico do marcador selecionado). A PCR foi realizada em um termociclador *Labcycler®* (Sensoquest, Alemanha). Um controle negativo (água ultrapura) foi incluído para

se avaliar a presença de contaminantes. Para a visualização dos produtos de amplificação, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% corado com Unisafe Dye® Nucleic Acid Staining Solution (20.000x) na quantidade de 1,5 µl para cada 30 mL de tampão Tri-acetato-EDTA (TAE) 0,5 M. A eletroforese foi realizada a 100 V por 30 minutos e, em seguida, o gel foi visualizado em transluminador de luz UV para a confirmação da presença de bandas com o tamanho esperado.

Tabela 2. Primers utilizados para amplificação e sequenciamento de genes ribossomais e mitocondriais dos parasitos encontrados no presente estudo. F/R: *Forward* e *Reverse*. pb: pares de bases nucleotídicas

Marcador	Primer (F/R)	Tamanho (~pb)	Sequência dos primers	Uso	Referência
Ribossomal					
28S	Dig12	1200	AAGCATATCACTAAGCGG	PCR/seq.	Tkach et al., 2003
	1500R		GCTATCCTGAGGGAAACTTCG		
	300F	400	AGGGTTCGATTCCGGAG	seq.	Littlewood & Olson, 2001
	ECD2		AGGGTTCGATTCCGGAG		
ITS2	3S	400	GGTACCGGTGGATCACTCGGCTCGTG	PCR/seq.	Bowles et al., 1995
	BD2		TATGCTTAAATTCAGCGGGT		
Mitochondrial					
<i>cox1</i> Barcode	123F	600	ATTCGTTTGA ACTATATGGA	PCR/seq.	Laidemitt et al., 2017
	858R		CATATGATGAGCCCAAACAAC		
<i>cox1</i> pós-Barcode	JB3	800	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT	PCR/seq.	Miura et al., 2005
	COI-R trema		CAACAAATCATGATGCAAAAGG		

4.5.3. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos obtidos a partir da PCR que apresentaram bandas únicas após eletroforese foram purificados utilizando polietilenoglicol (PEG) (20% PEG 8.000 em solução de NaCl 2,5M) (Promega, EUA). Para isso, o volume presente nos microtubos utilizados para PCR foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, foi adicionado o mesmo volume de PEG, a solução foi homogeneizada em vórtex e colocada em banho seco a 37 °C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma micropipeta, evitando a agitação do precipitado. Posteriormente, foram adicionados 125 µL de etanol a 80% refrigerado aos tubos, os quais foram centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm. Na próxima etapa, o sobrenadante foi descartado e o processo anterior repetido. Uma nova secagem foi realizada a 37 °C por 30 minutos, visando a eliminação completa do etanol presente nas amostras. Após esse processo, o precipitado foi ressuspensionado em 20 µL de água ultrapura e dosado (ng de DNA/µL de solução) em um espectrofotômetro de microvolume *NanoDrop*® Lite. Também foi feita uma nova eletroforese em gel de agarose 1%, conforme a metodologia previamente descrita, antes do envio das amostras para sequenciamento.

4.5.4. Sequenciamento de DNA

Os produtos de PCR purificados foram preparados em uma solução de concentração adequada contendo *primers forward* e *reverse* de acordo com as especificações determinadas pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda [Alvorada, RS: (<https://actgene.com.br/>)]. O sequenciamento bidirecional foi feito pelo método de Sanger através de capilaridade eletroforética em um sequenciador automático *ABI3500*, utilizando o kit *BigDye v3.1 Terminator* (Applied Biosystems).

4.5.5. Edição e análise das sequências

Os cromatogramas obtidos foram avaliados e editados utilizando o programa ChromasPro versão 2.0.1 (Technelysium Pty LTD, Austrália). As sequências consenso foram submetidas à pesquisa de similaridade utilizando o servidor BLAST (*Basic Alignment Search Tool*) (Altschul et al., 1990) para comparação com sequências disponíveis na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

(*National Library of Medicine*, EUA). O programa MEGA X (Kumar et al. 2018) foi utilizado para alinhar as sequências obtidas com outras disponíveis no GenBank através do algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994). Os alinhamentos obtidos foram cortados em cada extremidade da sequência mais curta.

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando modelos de substituição nucleotídica selecionados segundo o critério de Inferência Bayesiana (BIC), presente no programa MEGA X. As árvores filogenéticas foram construídas através dos métodos de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB), utilizando os programas MEGA X e MrBayes 3.2.6 (Ronquist et al., 2012), respectivamente. Os grupos externos foram selecionados com base em filogenias robustas disponíveis para trematódeos (Olson et al., 2005; Pérez-Ponce de León & Hernández-Mena, 2019).

Na análise por MV, a confiabilidade e robustez dos suportes nodais foram estimados por replicações não paramétricas de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 1000 repetições. As análises por IB foram realizadas através das cadeias de *Markov Monte Carlo* (MCMC), rodadas em duplicatas simultâneas de quatro cadeias, por 1.000.000 gerações e com uma frequência de amostragem a cada 100 gerações, onde 25% das árvores obtidas foram descartadas como '*burn-in*'. O suporte dos nós foi fornecido pela probabilidade posterior. As árvores filogenéticas obtidas foram visualizadas no programa FigTree 1.4.2 (Rambaut & Drummond, 2015) e editadas no Photoshop CSS Adobe® e PowerPoint®. As sequências obtidas serão depositadas no *GenBank* quando da publicação dos estudos.

4.6. Aspectos éticos e legais

A coleta de órgãos de animais de abatedouro foi autorizada pelo Serviço de Inspeção Municipal (SIM) de Pelotas e pelos veterinários responsáveis pela supervisão dos abatedouros visitados. O acesso ao patrimônio genético das amostras utilizadas em estudos moleculares foi devidamente registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

5. Resultados

5.1. Parasitos recuperados

Foram avaliados no presente estudo amostras de nove lotes de ruminantes abatidos, totalizando 25 rumens infectados por trematódeos, sendo 22 deles de bovinos e três de ovinos. Os animais infectados advieram de três cidades do Rio Grande do Sul: Pelotas, Jaguarão e Rio Grande. Os detalhes das coletas realizadas são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Detalhes das coletas realizadas em dois abatedouros na cidade de Pelotas, RS. Legenda: Jag.: Jaguarão; Pel.: Pelotas; RG: Rio Grande; Morf: Morfotipo

Data da Coleta	Abatedouro	Origem	Animais Abatidos	Rumens Coletados	Morf. I	Morf. II	Total de Parasitos
17/05/2022	A	Pel.	38	5	926	-	926
25/05/2022	A	RG	31	1	48	-	48
28/06/2022	B	RG	10	6	737	59	796
30/06/2022	B	Jag.	12	1	3	-	3
05/07/2022	B	Jag.	6	1	303	-	303
07/07/2022	B	RG	8	7	441	12	453
13/07/2022	B	Jag.	10	1	1	-	1
14/07/2022	B	Jag.	10	1	1	-	1
26/07/2022	B	Pel.	7	2	438	-	438
TOTAL					2898	71	2969

Os bovinos parasitados apresentavam cargas parasitárias mais altas que as de ovinos, variando entre 5-458 trematódeos por indivíduo, enquanto as ovelhas apresentaram de 1 a 3 parasitos por hospedeiro. Um total de 2969 parasitos foram obtidos a partir dos tecidos coletados, sendo identificados dois morfotipos distintos. Estes apresentaram diferenças macroscópicas em tamanho, posição das ventosas e estrutura do poro genital. O Morfotipo I (Figura 4A), apresentou um corpo mais alongado, com um tamanho médio de 0,7 cm, com pequenas variações em indivíduos menos desenvolvidos, um acetábulo terminal e um poro genital menor e pouco protundido. Foi o morfotipo mais presente, estando presente em todos os rumens parasitados, totalizando 2898 espécimes. O Morfotipo II (Figura 4B), foi

caracterizado por apresentar um corpo menor e mais arredondado, com um tamanho médio de 0,4 cm, acetábulo subterminal que acompanha a curvatura do corpo durante a fixação em formol, além da presença de um poro genital grande e com protusão acentuada após o processo de fixação do material. Esse segundo morfotipo esteve presente em cinco rumens de bovinos, nos quais foram coletados um total de 71 exemplares. Casos de coinfeção por esses dois morfotipos preliminarmente caracterizados foram observados em todos os rumens infectados pelo Morfotipo II.

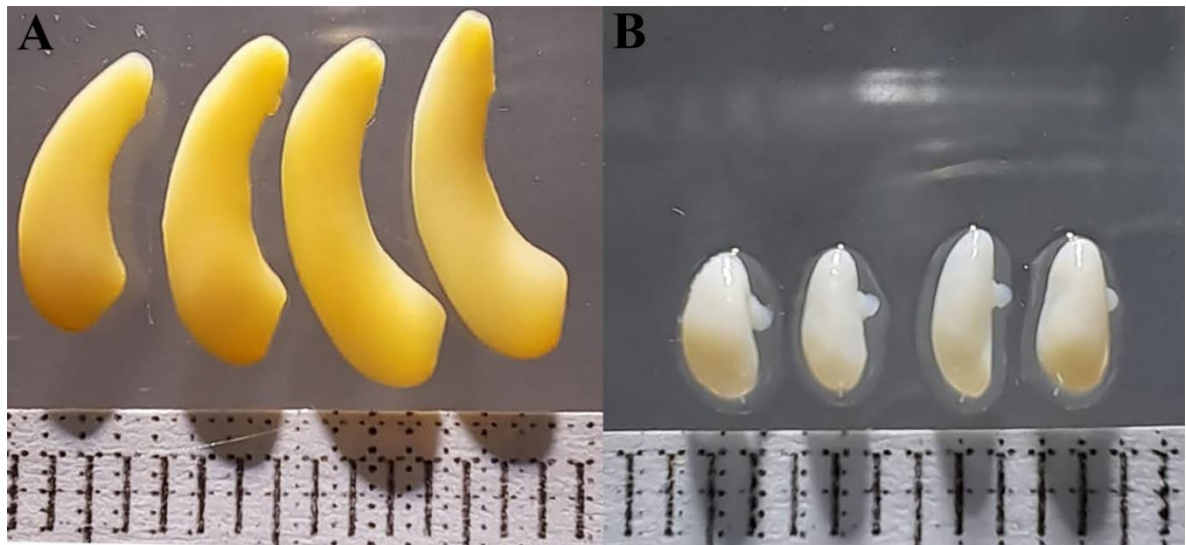


Figura 4. Morfotipos de paranfístomos encontrados em rumens coletados. (A) Morfotipo I. (B) Morfotipo 2. Escala: 1 mm.

5.2. Identificação taxonômica

5.2.1. Morfotipo I: *Paramphistomum leydeni* Nasmak, 1937

5.2.1.1 Caracterização morfológica

As análises morfológicas do primeiro morfotipo revelaram diversas características associadas à Paramphistomidae (Figura 5), mais especificamente ao gênero *Paramphistomum* (Tabela 4).

Descrição: Corpo cônico alongado, curvado ventralmente. Tegumento coberto por papilas mais numerosas na porção anterior. Acetábulo subterminal ventral do tipo paramphistomum, caracterizado por uma fileira dupla de unidades musculares dorsais externas. Abertura oral terminal. Faringe do tipo liorchis, caracterizada por uma superfície interna coberta por papilas. Bulbo esofaríngeo e esfíncter ausentes. Cecos intestinais retos dispostos nas porções laterais do corpo, atingindo o nível acetabular e com fundo cego. Testículos lobados, em sequência e com tamanhos semelhantes. Ovário pós-testicular arredondado. Vitelária disposta nas porções laterais do corpo, se estendendo desde o nível da faringe até o acetábulo. Ventosa genital ausente. Poro genital no nível da bifurcação dos cecos intestinais, abaixo da abertura faríngeo.

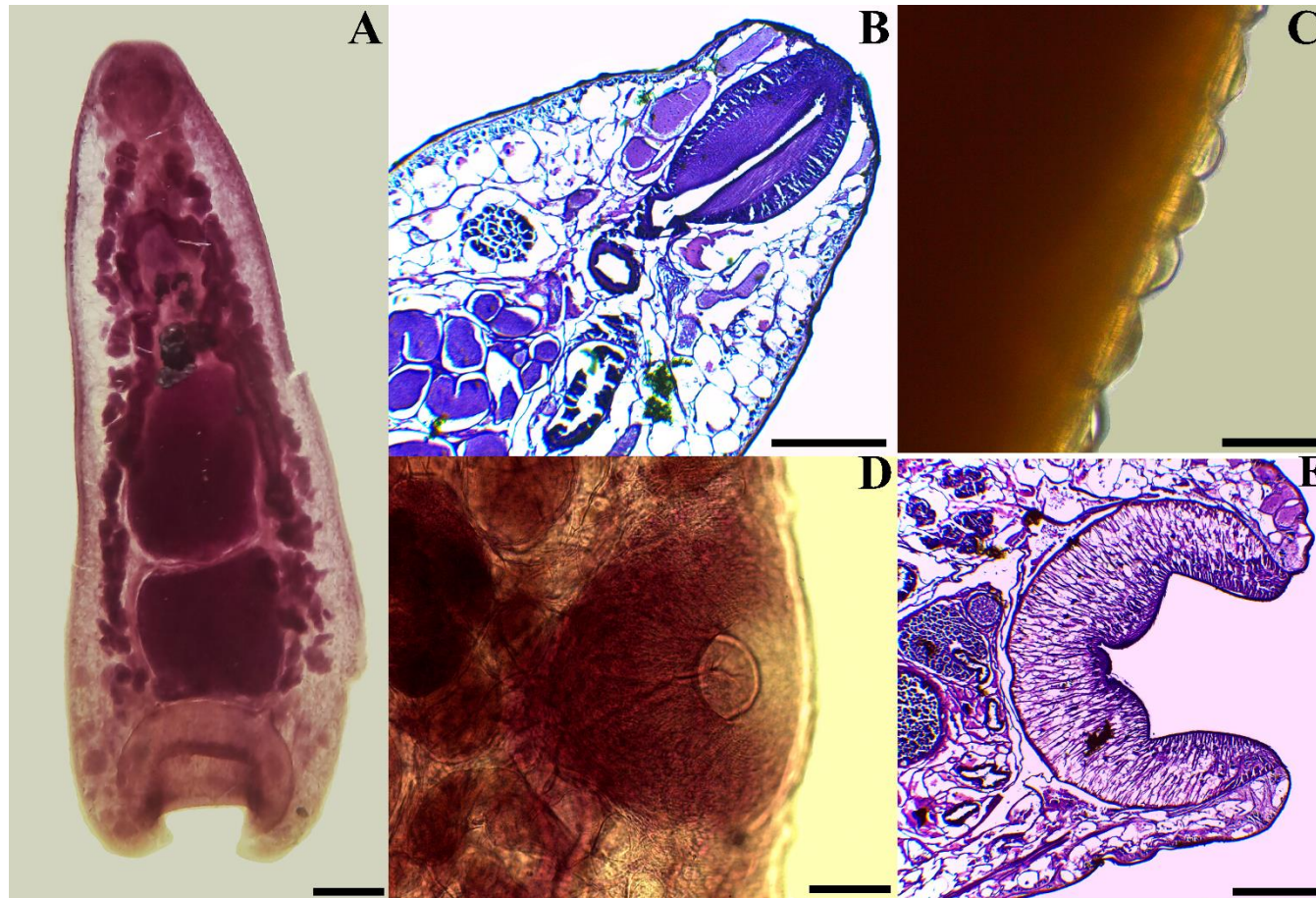


Figura 5. *Paramphistomum leydeni*, forma adulta obtida do rúmen de bovino coletado em Pelotas, RS. (A) Corte sagital de exemplar adulto. (B) Detalhe da faringe do tipo liorchis. (C) Detalhe das papilas tegumentares características da espécie. (D) Detalhe do poro genital levemente protundido. (E) Detalhe do acetábulo do tipo paramphistomum. Escalas: 1 mm (A), 500 μm (B, E), 100 μm (C), 200 μm (D).

Tabela 4. Medidas obtidas a partir de estudos morfométricos de exemplares de *Paramphistomum leydeni* com descrições prévias disponíveis na literatura de referência e registro prévio da espécie na região de Pelotas, RS. Legenda: C: Comprimento; L: Largura;

*baseado em cortes histológicos de três exemplares. Medidas em micrômetros, exceto indicação contrária

Referência		Presente Estudo*	Eduardo (1982)	Sey (1991)	Velásquez-Maldonado (1976)
Localidade		Pelotas, RS	Estocolmo	Várias localidades	Pedro Osório e Pelotas, RS
Corpo	C	7 mm	4,1-6,8 mm	3,8-6,2 mm	5,31-5,47 mm
	L	2 mm	2-3,38 mm	1,9-3,2 mm	2,63-2,68 mm
Faringe	C	1004	570-840	490-820	570-580
	L	730	510-580	-	-
Poro Genital	D	728	-	-	-
Testículo	C	2191	530-970	420-960	570-1010
	L	2501	1010-1540	790-1870	210-680
Acetábulo	C	2118	1280-1810	1120-1760	1570-1840
	L	1059	-	-	-
Ovos	C	149 (137-155)	145-150	142-153	-
	L	87 (70-99)	75-78	71-79	-

5.2.1.2 Caracterização molecular

Foram obtidos fragmentos dos marcadores moleculares ribossomais 28S e ITS-2 e mitocondriais *cox-1* região *barcode* e pós-*barcode*. Os resultados obtidos para o marcador ITS-2 (Figura 8) corroboram a identificação morfológica do morfotipo 1 como *Paramphistomum leydeni*, apresentando um clado bem suportado que agrupa as amostras aqui obtidas com outras espécies parasitas de ruminantes. Na análise do marcador 28S (Figura 7), foi observado um agrupamento das amostras num clado contendo *Explanatum explanatum* (Creplin, 1847) e *P. cervi*, a segunda sendo a espécie-tipo do gênero. Porém, o clado resultante não apresentou um suporte nodal alto (0.7 para IB e 42% para MV). Ademais, é importante notar a polifilia presente em indivíduos pertencentes a *Paramphistomum*, onde sequências de *P. epiclitum* e *Paramphistomum* sp. não agruparam em um clado monofilético representativo do táxon.

Quando se observam as árvores obtidas a partir de *cox-1* (Figuras 9-11), nota-se a formação de um clado bem suportado incluindo indivíduos de *P. leydeni* tanto para a região *barcode* quanto para a pós-*barcode*. Não obstante, a relação entre *P. leydeni* e *P. cervi* continua incerta, formando um grupo monofilético quando se avalia a região menor do marcador *cox-1* (264 pb), porém com um baixo suporte nodal. Quando se analisa a região maior do marcador e a região pós-*barcode*, os táxons sequer formam um grupo monofilético. Ao se avaliar a relação com outros indivíduos de *Paramphistomum*, é possível notar que as sequências da região menor do marcador *cox-1* pós-*barcode* corroboram a polifilia no gênero, onde sequências de *P. epiclitum* não agruparam com a espécie-tipo ou com as presentes amostras.

5.2.1.3 Comentários taxonômicos

As análises moleculares das diferentes regiões do marcador mitocondrial *cox-1* (Figuras 9-11) suportaram a identificação da espécie como *P. leydeni*, devido à presença de um clado monofilético bem suportado incluindo sequências da China. Essa identificação foi corroborada pelo marcador ITS-2 (Figura 8), onde um clado composto apenas por exemplares de *P. leydeni* também apresentou suporte nodal alto. A espécie foi confirmada a partir de estudos morfológicos posteriores, onde a visualização de estruturas diagnósticas, como a presença de papilas características distribuídas em fileiras pelo corpo, com uma maior concentração na porção anterior.

5.2.1.4 Sumário Taxonômico

Paramphistomum leydeni Nasmark, 1937

(Sinônimos: *Paramphistomum julimarinorum* Velázquez-Maldonado, 1979;

Paramphistomum nicabradorum Velázquez-Maldonado, 1979)

Hospedeiros definitivos: *Bos taurus*, *Ovis aries*

Sítio de infecção: Rúmen

Localidades: Jaguarão, Pelotas e Rio Grande; RS.

Intensidade de infecção:

Bovinos: 1-458 indivíduos por amostra de rúmen

Ovinos: 1-3 indivíduos por amostra de rúmen

Outros hospedeiros conhecidos: *Bison bonasus* L., *Bubalus bubalis* L., *Procapra picticaudata*

Hodgson, 1846, *Alces alces* L., *Capreolus capreolus* L., *Cervus elaphus* L., *Cervus nippon*

Temminck, 1838, *Rangifer tarandus* L. (Sey, 1991)

5.2.2 Morfotipo II: *Balanorchis anastrophus* *Fischoeder, 1901*

5.2.2.1 Caracterização morfológica

O segundo morfotipo analisado apresentou diferenças notáveis quando comparado aos espécimes de *Paramphistomum*, como um tamanho visivelmente menor, poro genital próximo da região central do corpo e a protrusão do aparelho reprodutor após a morte, o que auxiliou na separação de indivíduos através da morfologia externa. Estruturas e detalhes associados ao gênero monotípico *Balanorchis* foram evidenciados durante a análise de lâminas histológicas (Tabela 5).

Descrição: Corpo cônico, quase oval, coberto por pequenas papilas concentradas ao redor da faringe e do acetábulo. Faringe do tipo balanorchis na porção anterior terminal do corpo, com um par de divertículos pouco desenvolvidos e cercada de fileiras de papilas longas e triangulares posicionadas ao redor da abertura oral, com tamanhos reduzidos nas fileiras mais próximas à abertura. Acetábulo subterminal do tipo streptocoelium (*sensu* Näsmark, 1937) próximo à extremidade posterior do corpo, com diâmetro superior ao da abertura faringeal. Cecos laterais dispersos pelo corpo, atingindo o nível do acetábulo. Testículos não lobados, arredondados, de tamanho similar e dispostos paralelamente na porção inferior do corpo, acima do acetábulo. Ovário esferoidal acima do acetábulo, posicionado na altura da porção inferior dos testículos. Útero disperso desde o poro genital e se estendendo entre os testículos. Vitelária em porções laterais, com folículos se estendendo desde a bifurcação esofagiana até o acetábulo. Bolsa do cirro presente, desenvolvida e normalmente evertida durante o processo de fixação. (Figura 6).

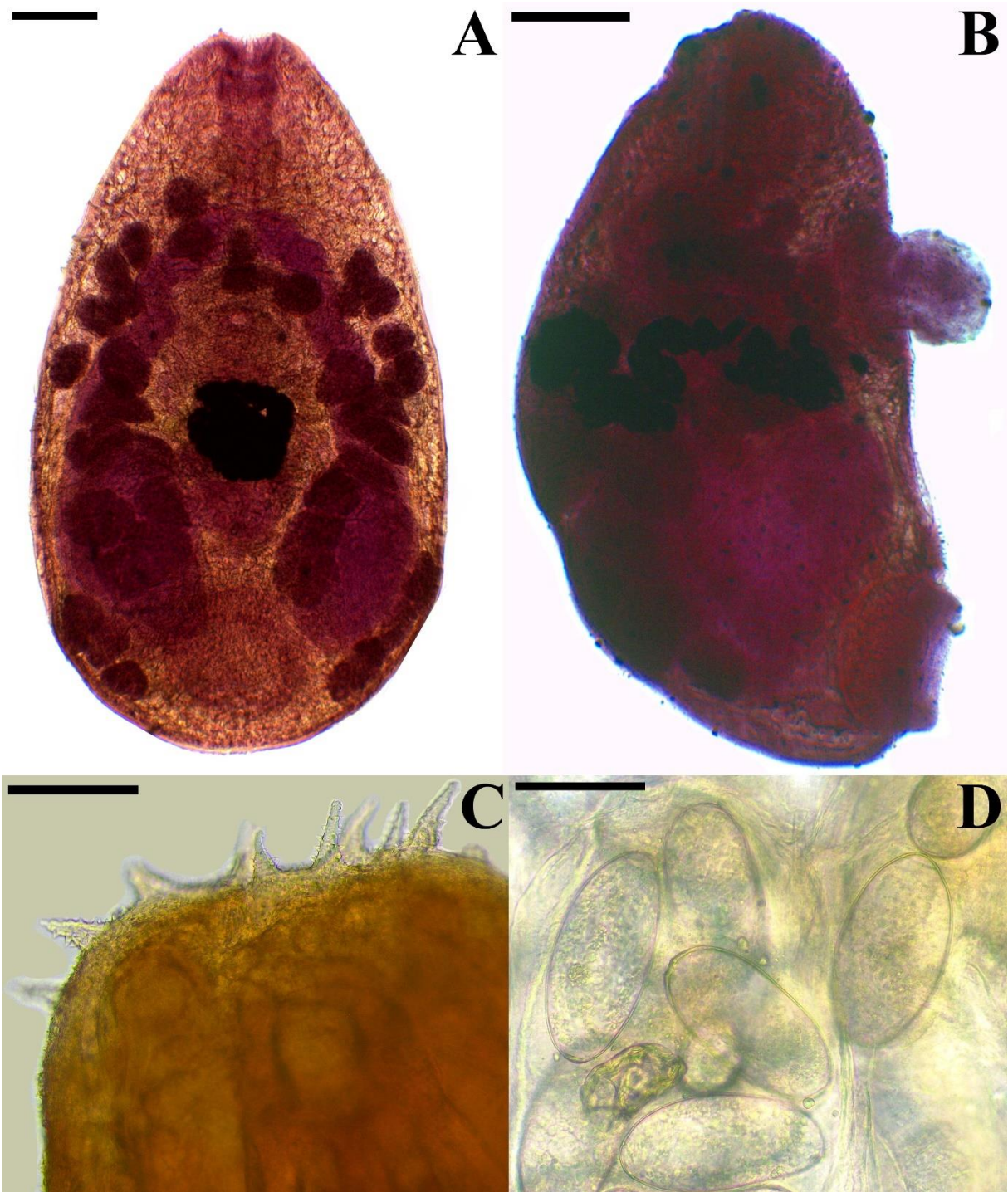


Figura 6. *Balanorchis anastrophus*, forma adulta obtida do rúmen de bovino coletado em Pelotas, RS. (A) Verme prensado. (B) Visão lateral do corpo com bolsa do cirro protundida. (C) Detalhe das papilas faríngeas. (D) Ovos presentes no interior do parasito. Escalas: 500 μm (A, B), 200 μm (C), 100 μm (D).

Tabela 5. Comparação de medidas obtidas a partir de estudos morfométricos de exemplares de *Balanorchis anastrophus* com descrições prévias disponíveis na literatura de referência e registro prévio da espécie na região de Pelotas, RS. Legenda: C: Comprimento; L: Largura;

Referência		Presente Estudo	Eduardo (1982)	Sey (1991)	Travassos et al. (1969)
Localidade		Pelotas, RS	Mato Grosso, Brasil	-	Brasil
Corpo	C	3,7 (2,9-4,3) mm	1,91-3,7 mm	1,7-3,5 mm	3-4 mm
	L	2,3 (1,6-2,3) mm	1-1,3 mm	0,9-1,3 mm	1,2 mm
Faringe	C	721 (550-871) μm	160-250 μm	140-230 μm	400 μm
	L	362 (279-457) μm	200-230 μm	-	200 μm
Poró Genital	C	657 (521-757) μm	-	-	-
	L	714 (643-786) μm	-	-	-
Ovário	C	264 (221-300) μm	150-170 μm	120-140 μm	-
	L	252 (143-364) μm	160-200 μm	120-210 μm	-
Testículo Direito	C	1194 (803-1442) μm	350-480 μm	320-430 μm	-
	L	750 (566-949) μm	500-1200 μm	-	-
Testículo Esquerdo	C	1162 (876-1534) μm	320-450 μm	460-500 μm	-
	L	766 (603-1023) μm	480-1100 μm	-	-
Acetábulo	C	704 (529-822) μm	400-580 μm	380-530 μm	400 μm
	L	737 (584-821) μm	-	-	-
Ovo	C	160 (156-173) μm	124-138 μm	124-131 μm	125-135 μm
	L	79 (73-86) μm	73-80 μm	71-82 μm	65-80 μm

5.2.2.2 Caracterização molecular

Foram obtidos fragmentos dos marcadores moleculares ribossômicos 28S (Figura 7) e ITS-2 (Figura 8) e mitocondrial *cox-1* região pós-*barcode* (Figuras 9 e 10), não sendo possível obter sequências para a região *barcode* do *cox-1*. As sequências não apresentaram alta similaridade com outras espécies disponíveis no GenBank, sendo agrupadas em um clado composto apenas pelas amostras aqui obtidas. Esse clado agrupou com indivíduos da família Diplodiscidae nas árvores de 28S, ITS-2 e da região maior de *cox1* pós-*barcode*, mas essa relação não foi corroborada pela árvore da região menor de *cox1* pós-*barcode*. O suporte nodal do agrupamento das amostras foi alto, assim como seu agrupamento com Diplodiscidae, apesar da divergência entre os grupos ser alta, variando entre 7,21 e 8,44% para 28S.

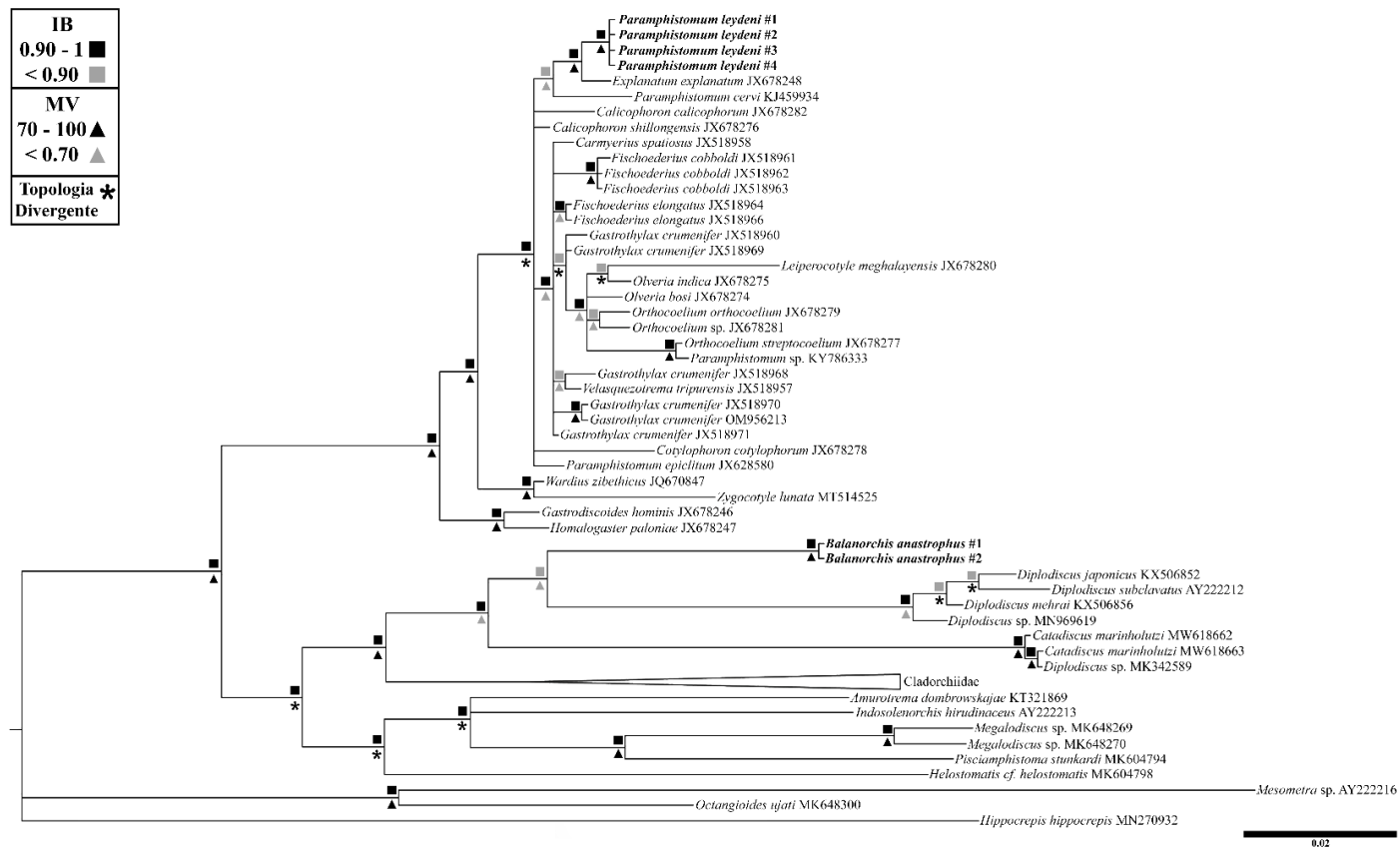


Figura 7. Relação filogenética baseada na análise de seqüências parciais do marcador ribossomal 28S para as amostras de *Paramphistomum leydeni* e *Balanorchis anastrophus* (em negrito) e outras espécies de Paramphistomoidea com seqüências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo GTR+G+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a legenda representada no canto superior esquerdo. Divergências entre as topologias de IB e MV estão representadas por *. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Hippocrepis hippocrepis* L. foi usado como grupo externo.

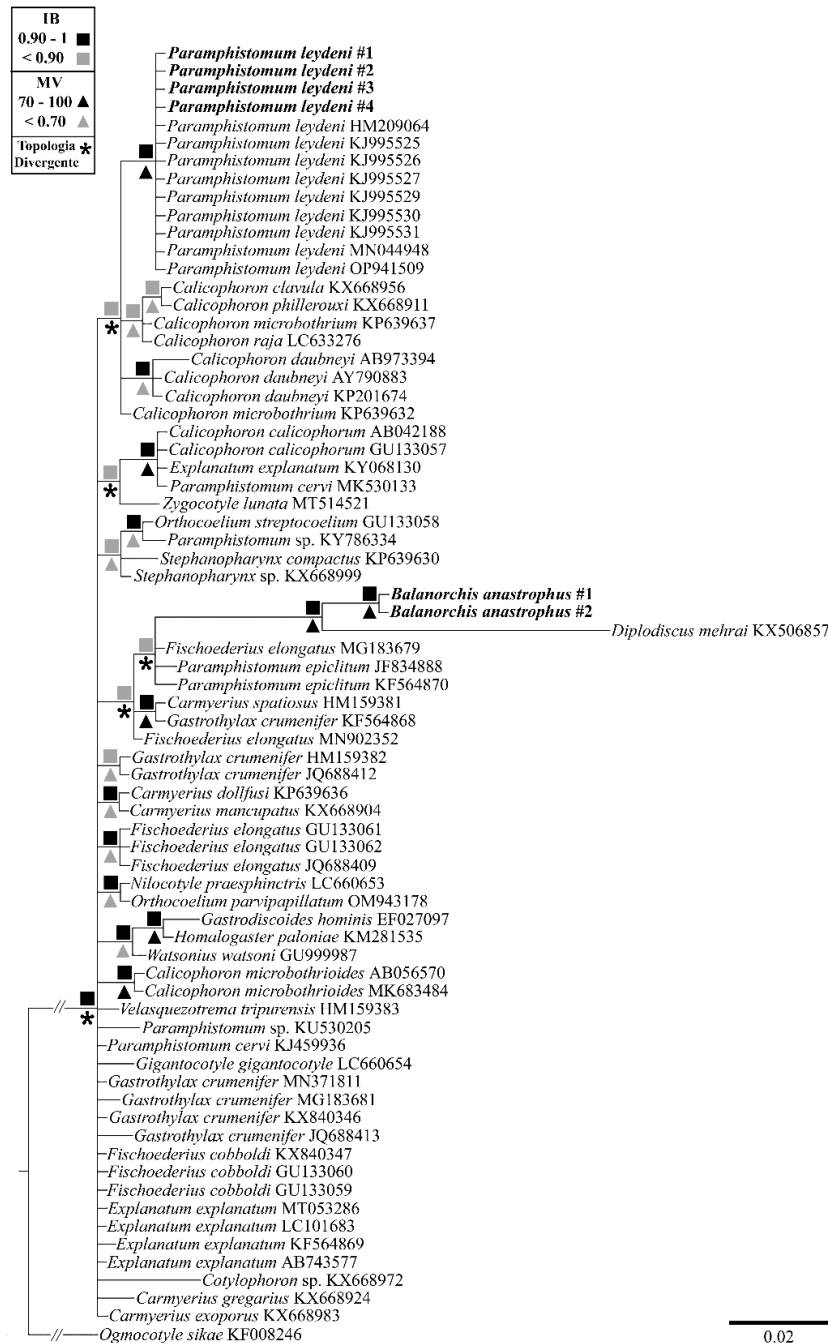


Figura 8. Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região transcrita interna (ITS-2) para as amostras de *Paramphistomum leydeni* e *Balanorchis anastrophus* (em negrito) e outras espécies de Paramphistomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo K2+G. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a legenda representada no canto superior esquerdo. Divergências entre as topologias de IB e MV estão representadas por *. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Ogmocotyle sikae* (Yamaguti, 1933) foi usado como grupo externo.

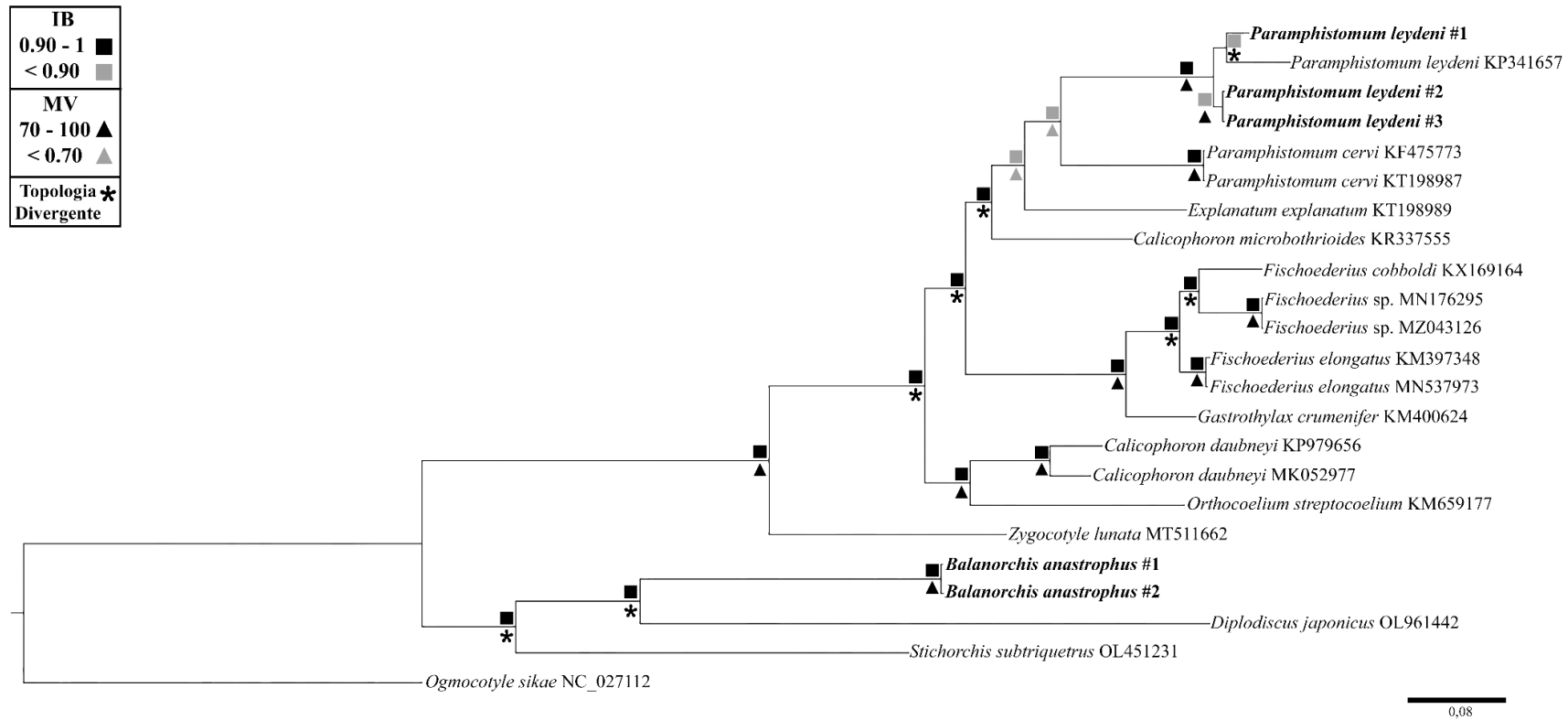


Figura 9. Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região maior do marcador mitocondrial *cox-1* pós-barcode (800 pb) para as amostras de *Paramphistomum leydeni* e *Balanorchis anastrophus* (em negrito) e outras espécies de Paramphistomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo TN93+G+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a legenda representada no canto superior esquerdo. Divergências entre as topologias de IB e MV estão representadas por *. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Ogmocotyle sikaе* foi usado como grupo externo.

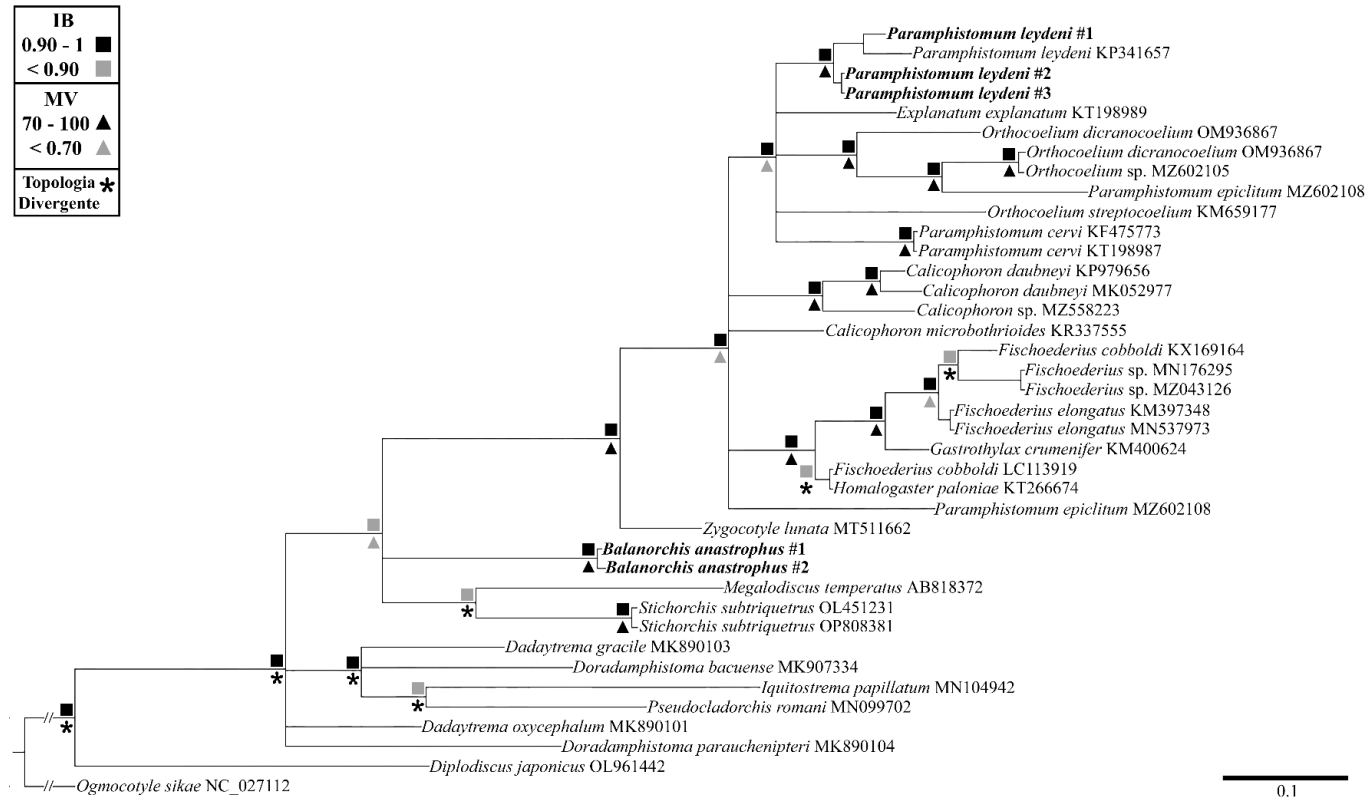


Figura 10. Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais da região menor do marcador mitocondrial *cox-1* pós-barcode (400 pb) para as amostras de *Paramphistomum leydeni* e *Balanorchis anastrophus* (em negrito) e outras espécies de Paramphistomoidea com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo TN93+G+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a escala representada no canto inferior esquerdo. Divergências entre as topologias de IB e MV estão representadas por *. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Ogmocotyle sikae* foi usado como grupo externo.

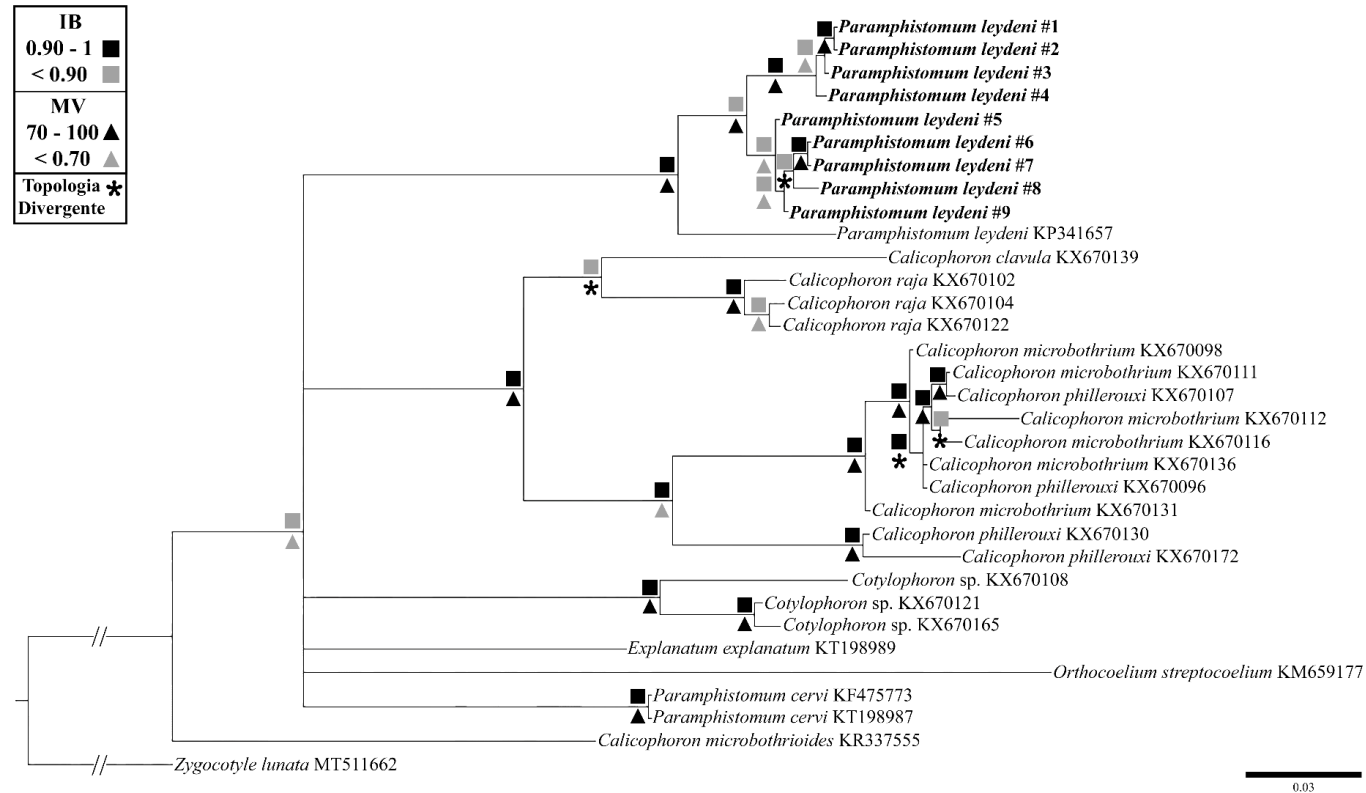


Figura 11. Relação filogenética baseada na análise de sequências parciais do marcador mitocondrial cox-1 região barcode (600 pb) para as amostras de *Paramphistomum leydeni* (em negrito) e outras espécies de Paramphistomidae com sequências disponíveis para comparação no GenBank. A árvore representada foi obtida por Inferência Bayesiana (IB) utilizando-se o modelo TN93+G+I. O suporte dos nós são fornecidos pelos valores de probabilidade posterior (■) e bootstrap (▲), de acordo com a legenda representada no canto superior esquerdo. Divergências entre as topologias de IB e MV estão representadas por *. A barra de escala indica o número de substituições por site. *Zygocotyle lunata* (Diesing, 1836) foi usado como grupo externo.

5.2.2.3 Comentários taxonômicos

Apesar das sequências obtidas não terem apresentado alta similaridade com outras disponíveis, as análises morfológicas permitiram a identificação da espécie através de detalhes morfológicos característicos. Esses incluem papilas faríngeas alongadas e ramificadas, um poro genital central, largo e protruso, além do formato arredondado e tamanho do corpo.

5.2.2.4 Sumário Taxonômico

Balanorchis anastrophus Fiscoeder, 1901

(Sinônimo: *Verdunia tricornata* Lahille & Joan, 1917)

Hospedeiro definitivo: *Bos taurus*

Sítio de infecção: Rúmen

Localidades: Rio Grande, RS

Intensidade de infecção: 1-51 indivíduos por amostra de rúmen

Outros hospedeiros conhecidos: *Blastocerus dichotomus* (Illiger, 1815), *Odocoileus cariacou* Boddaert, 1784 (Sey, 1991)

6. Discussão

No presente estudo, a avaliação de trematódeos recuperados nos rumens de bovinos e ovinos abatidos na cidade de Pelotas revelou a presença de duas espécies de representantes de Paramphistomoidea. As análises morfológicas e moleculares permitiram confirmar a ocorrência de *P. leydeni* no Brasil. Além disso, as primeiras sequências moleculares foram obtidas para *B. anastrophus*, o que possibilitou a avaliação da posição filogenética desta espécie frente aos diferentes táxons incluídos na mesma superfamília.

No Brasil, foram registradas 14 espécies de Paramphistomoidea parasitando ruminantes, incluindo espécies de *Balanorchis*, *Cotylophoron*, *Paramphistomum* e *Zygocotyle* (Fernandes et al., 2015). Apesar de sua associação com a pecuária e, conseqüentemente, parasitoses associadas a ela, registros de paramfístomos no Brasil não se limitam à região Sul do país. Registros de *Cotylophoron* parasitando ruminantes vêm sendo descritas em diversas regiões, incluindo estados como Ceará, Maranhão, Pará, Rondônia e Roraima (Costa et al., 1990; Costa & Guimarães, 1992; Miranda & Costa, 1999). Recentemente, Amaral et al. (2020) descreveram a nova espécie *C. marajoensis* parasitando bubalinos no Ceará, além de apresentarem as primeiras sequências moleculares de Paramphistomidae do Brasil, disponibilizando uma referência para estudos futuros sobre a família. Grande parte dos relatos está associada a animais de produção, principalmente bovinos, enquanto apenas *B. anastrophus* aparenta estar restrito ao continente americano. A pecuária acaba recebendo um papel central no estudo de paramfístomos no país, especialmente por sua importância econômica e pelas grandes áreas ocupadas por gado bovino, bubalino, caprino e ovino (Cavalcante et al., 1996; Mattos & Ueno, 1996; Miranda & Costa, 1999; Amaral et al., 2020). Apesar disso, a relevância de ruminantes silvestres utilizados para caça em outros países americanos não pode ser ignorada. A caça de cervídeos é uma prática de suma importância no comércio da América do Norte e, com a expansão das áreas ocupadas por ruminantes de produção, o impacto de parasitos presentes em ambos grupos merece atenção (Snider, 1986; Marques et al., 2007).

As espécies do gênero *Paramphistomum* são caracterizadas por um corpo cônico e robusto, ausência de uma ventosa genital, *pars musculosa* pouco desenvolvida e um acetábulo do tipo paramphistomum ou pisum. Uma das espécies mais registradas é *P. leydeni*, a qual é associada ao parasitismo de bovinos, bubalinos, caprinos, cervídeos e ovinos (Eduardo, 1982; Sey, 1991). Essa espécie foi relatada no continente asiático (China e Turquia) (Ozdam et al., 2010; Ma et al., 2015; Padak & Karakuş, 2021), e no continente europeu (Alemanha, Croácia,

Finlândia, França e na então Checoslováquia) (Graber et al., 1980; Nikander & Saari, 2007; Samnaliev et al., 1984; Sindičić et al., 2017; Wiedermann et al., 2021). No Novo Mundo, a espécie também foi encontrada na Argentina, Colômbia e Venezuela. No Brasil, registros prévios estão limitados a um trabalho de Velásquez-Maldonado (1976) em que amostras de formas adultas foram encontradas em bovinos de produção no Rio Grande do Sul.

A identificação *P. leydeni* aqui relatada foi baseada tanto em critérios morfológicos quanto moleculares. Do ponto de vista morfológico, estruturas diagnósticas descritas em trabalhos taxonômicos de referência do grupo, i.e. papilas tegumentares presentes na porção anterior do corpo, foram observadas, confirmando a identificação (Eduardo, 1982; Sey, 1991). Os dados moleculares forneceram informações que direcionaram e suportaram a identificação morfológica, principalmente quando as sequências aqui obtidas foram comparadas com amostras obtidas por Wiedermann et al. (2021) de bovinos provenientes da Alemanha. As amostras aqui obtidas apresentaram similaridades entre 96,79-99,81% com exemplares alemães para o marcador *cox-1* região *barcode*, justificando sua identificação como *P. leydeni*. Apesar disso, as sequências obtidas por Wiedermann et al. apresentavam um tamanho significativamente menor que os demais fragmentos incluídos nas análises filogenéticas do marcador ribossomal, portanto, apesar de oferecerem informações relevantes para a identificação dos trematódeos, não foram incorporadas à filogenia aqui representada devido a uma consequente perda de informações decorrente do menor tamanho dos fragmentos.

A identificação é corroborada pelas diferentes filogenias obtidas a partir do marcador *cox-1*, onde as presentes sequências formaram um clado bem suportado com amostras chinesas de *P. leydeni* encontrado em cabras por Ma et al. (2015). Apesar disso, os valores de divergência com tais amostras foram consideravelmente maiores (5,08-6,01%). A falta de descrições morfológicas associadas a ambas caracterizações moleculares dificultam um esclarecimento das relações entre as diferentes amostras, sendo necessários novos estudos e um número maior de sequências para uma melhor elucidação desse clado.

A análise da região ITS-2, que possui sequências de amostras de *P. leydeni* de diferentes localidades (Argentina, China, Turquia e Uruguai), revelou um agrupamento das amostras aqui obtidas com os demais isolados da espécie em um clado monofilético bem suportado. Além do mais, as sequências apresentaram significativas divergências (1,5-2,63%) quando comparadas a outras espécies do gênero, como *P. cervi*, *P. epiclitum* e duas amostras identificadas a nível de gênero, corroborando a identificação da espécie. Apesar disso, a região não se mostrou eficaz

na elucidação das relações entre diferentes haplótipos, sendo indicada 100% de similaridade entre todas as amostras da espécie. Esse fenômeno é esperado quando se considera a conservação elevada do DNA nuclear, onde ele apresenta mecanismos de revisão e reparo durante a replicação, tornando variações e mutações menos comuns. Isso difere do DNA mitocondrial, o qual não possui tal mecanismo e, conseqüentemente, apresenta uma taxa de mutação mais elevada e maiores divergências entre haplótipos da mesma espécie. Tendo em vista a discrepância entre o número de sequências disponíveis em comparação com as outras regiões do DNA (mitocondrial e ribossomal), sua eficiência para a comparação intraespecífica é questionada, como relatado por outros autores (Laidemitt et al., 2017) o que reforça a importância da obtenção de sequências da região mitocondrial do DNA para uma melhor resolução das relações entre espécies.

Ao se avaliar a posição do gênero *Paramphistomum* através das árvores, leva-se em consideração a espécie-tipo *P. cervi* definindo as características do táxon. Com isso, uma clara parafilia é observada dentro do gênero através das árvores obtidas, tendo em vista que não foram formados clados monofiléticos bem suportados incluindo as espécies descritas como *Paramphistomum*. Quanto ao agrupamento de *P. leydeni* e *P. cervi*, visando a corroborar a posição de sua posição no gênero, apenas a árvore da região maior de *cox-1* pós-barcode apresentou essa monofilia, porém com um suporte nodal baixo tanto para IB, quanto para MV. A filogenia de 28S inclui as duas espécies em um clado, porém juntamente de *Explanatum explanatum* (Creplin, 1847), além de apresentar um suporte nodal baixo. Esses fatores somados levam a um questionamento sobre a posição de *P. leydeni* dentro do gênero, tendo em vista suas divergências filogenéticas com a espécie-tipo. Foi notado um agrupamento próximo entre *P. leydeni* e *E. explanatum* na árvore de 28S e na região menor de *cox-1* pós-barcode, porém essa relação não foi corroborada pelas demais árvores. Para uma melhor elucidação desse agrupamento, futuros estudos são necessários para que a morfologia dos exemplares seja comparada, além da obtenção de sequências de outros haplótipos que complementem as informações atuais.

O segundo morfotipo coletado foi identificado como *Balanorchis anastrophus*, identificado a partir de características morfológicas diferenciais da família Balanorchiidae Stunkard, 1925, também baseadas em descrições e chaves taxonômicas de paranfístomos (Eduardo, 1986; Sey 1991). As principais características descritas incluem a presença de papilas faríngeas ramificadas e um poro genital protusível na porção central do corpo. Com o presente

trabalho apresentando as primeiras sequências moleculares para a espécie, ressalta-se a necessidade de mais estudos para uma resolução de sua classificação taxonômica, ciclo biológico e distribuição.

O gênero monotípico *Balanorchis* Fiscoeder, 1901 foi descrito a partir de exemplares coletados parasitando *Blastocerus dichotomus* coletados no Brasil. A taxonomia do gênero sofreu diversas alterações à medida que novas análises foram realizadas, tendo sido incluído no gênero *Verdunia* como *V. tricornata* por Lahille & Joan (1917), sendo sinonimizada com *B. anastrophus* por Travassos em 1924. Originalmente, Fiscoeder incluiu *Balanorchis* na subfamília Cladorchiinae Fiscoeder, 1901, dentro de Paramphistomidae, sendo posteriormente incluída na subfamília Balanorchiinae por Stunkard (1925). Atualmente, Balanorchiidae se encontra dentro dos Paramphistomoidea, decorrente da classificação de Cladorchoidea como a família Cladorchiidae feita por Yamaguti (1971). Apesar de uma intensa jornada taxonômica, as descrições de *B. anastrophus* e suas reclassificações foram inteiramente baseadas em estudos morfológicos, sem informações moleculares para uma classificação mais precisa, além da ausência de estudos envolvendo formas larvais que possam ser associadas a hospedeiros intermediários.

Os registros de *B. anastrophus* são mais limitados geograficamente em comparação ao gênero *Paramphistomum*. Apesar de sua importância por também parasitarem ruminantes de produção, sua distribuição é mais restrita, sendo associada a países da América do Sul, porém é importante se considerar a possibilidade de que o número de registros não reflita sua real dispersão (Szidat & Ostrowski de Núñez, 1962; Schiffo & Lombardero, 1974; Amato et al., 1982; Sey, 1991; Baptista-Farias et al., 1992). Até o momento, seus registros estão limitados a alguns países da América do Sul, incluindo Argentina, Brasil, Paraguai, Uruguai e Venezuela, infectando bovídeos e cervídeos (Sey, 1991; Fernandes et al., 2015). *Balanorchis anastrophus* já foi associado a infecções fatais em ruminantes de produção, demonstrando seu potencial impacto na pecuária (Schiffo & Lombardero, 1974). Esses casos podem ser mais frequentes do que está relatado, considerando a falta de obrigatoriedade de notificação dessas infecções e a possibilidade de ocorrência de infecções subclínicas (Sanabria & Romero, 2008; Dick et al., 2019). Para mais, sua dispersão não só pela América do Sul, mas por outros continentes pode também estar sendo subestimada, principalmente quando se considera a exportação de gado e a falta de informações sobre hospedeiros que podem manter seu ciclo em ecossistemas estrangeiros.

Quando observamos a posição de *B. anastrophus* na filogenia, sua separação dos demais parasitos de ruminantes é notável, como previamente mencionado, mas seu agrupamento com sequências de Diplodiscidae também chama atenção. Apesar do alto suporte para seu agrupamento nas árvores de 28S, ITS-2 e da região maior de *cox-1* pós-*barcode*, a filogenia para a região menor de *cox-1* pós-*barcode* não corrobora essa posição, colocando o clado de *Balanorchis* como um grupo à parte. O gênero *Diplodiscus* é composto principalmente por parasitos intestinais de anfíbios, mas possuindo representantes em peixes e répteis, utilizando moluscos planorbídeos como hospedeiros intermediários durante seu ciclo. Além de suas divergências biológicas, suas características morfológicas apresentam divergências significativas, tanto do corpo em geral, como em estruturas diagnósticas, principalmente no sistema reprodutivo, com o grupo sendo caracterizado pela presença de um único testículo (Sey, 1991). A falta de estudos moleculares envolvendo ambos os grupos e outros parasitos próximos a eles dificultam uma resolução dessa filogenia, sendo necessários novos trabalhos que ampliem o número de sequências disponíveis para paranfístomos, especialmente da América do Sul.

A topologia das árvores filogenéticas, revela a inclusão de *P. leydeni* e *B. anastrophus* em clados distintos nas filogenias em que ambas espécies foram incluídas (28S, *cox-1* pós-*barcode* e ITS-2), suportando a separação de Balanorchiidae dos Paramphistomidae proposta atualmente. Apesar de ambas famílias apresentarem hospedeiros, ciclos de vida e sítios de infecção similares, *B. anastrophus* trata-se de uma espécie originária região conhecida como “Novo Mundo”, tendo seus registros associados à América do Sul (Schiffo & Lombardero, 1974; Eduardo, 1986b; Sey, 1991; Baptista-Farias et al., 1992), enquanto os demais Paramphistomoidea parasitos de ruminantes incluídos na análise são nativos do Velho Mundo, levantando a hipótese de que esses grupos sejam evolutivamente distantes e a origem do parasitismo de rúmen tenha surgido independentemente. Enquanto isso, *P. leydeni* é uma espécie relatada principalmente na Eurásia (Graber et al., 1980; Samnaliev et al., 1984; Nikander & Saari, 2007; Ma et al., 2015; Sindičić et al., 2017), com sua introdução nas Américas aparentemente associada com a introdução de rebanhos europeus no continente, sendo a pecuária a principal responsável por sua difusão pelo território. Não se pode desconsiderar a possibilidade de uma transição dessas espécies entre o Novo e Velho Mundo até os dias atuais, onde o comércio de ruminantes continua sendo um mercado de extrema importância, além da influência e impacto de ruminantes silvestres, especialmente cervídeos,

ainda não ser bem conhecida nesse meio (Mirza et al., 2009; O'Toole et al., 2014; Sindičić et al., 2017; Carmo et al., 2022).

É interessante mencionar que o parasitismo por mais de uma espécie de paranfísto não é incomum na região sul do Brasil. Velázquez-Maldonado (1976), em um dos estudos mais amplos sobre a taxonomia destes parasitos de ruminantes realizados no país, relatou a presença de paranfístomos infectando bovinos provenientes de cinco cidades do Rio Grande do Sul, dentre elas, Pelotas. Seus resultados registram seis espécies pertencentes a *Paramphistomum* (considerando a sinonimização de *P. julimarinorum* e *P. nicabrasilorum* com *P. leydeni*) e o gênero monotípico *Balanorchis* em rumens. Esse trabalho descreveu *P. leydeni* como a espécie mais comum dentre os bovinos analisados quando se considera a sinonímia adotada posteriormente, além de corroborar uma menor incidência de *B. anastrophus* nos rumens. Os trabalhos de Velázquez-Maldonado (1976) e Amato et al. (1982) também abordam casos de coinfeção de *Paramphistomum* sp. e *B. anastrophus*, fenômeno também observado em bovinos no estudo atual. Isso levanta um questionamento sobre a presença de ambos hospedeiros intermediários coexistindo nos corpos d'água de fazendas do estado, permitindo que a metacercária de ambos esteja sendo ingerida pelos ruminantes. Outra hipótese vem do transporte de ruminantes durante sua vida, onde um animal pode se infectar em um ambiente, ser levado para outra fazenda e acabar se infectando com um segundo paranfísto no local.

Apesar dos estudos sobre a taxonomia molecular de Paramphistomoidea parasitos de ruminantes em outros continentes estarem em um estágio bastante avançado (O'Toole et al., 2014; Ploeger et al., 2017; Sindičić et al., 2017; Wiedermann et al., 2021), na América do Sul, há poucos estudos. Entre estes, alguns trabalhos envolvendo a paranfistomose foram elaborados nas últimas décadas na Argentina, incluindo caracterização morfológica, molecular e formas de tratamento para a infecção (Sanabria et al., 2009, 2011, 2014). As espécies de paranfístomos relatadas em território argentino são *B. anastrophus*, *Cotylophoron cotylophorum* (Fischoeder, 1901), *P. cervi* e *P. leydeni* (Sanabria et al., 2009; Fernandes et al., 2015), principalmente associadas a bovinos e ovinos. No Uruguai, apesar de um menor número de registros, as espécies *P. cervi* e *P. ichikawai* foram registradas em gado de produção (Fernandes et al., 2015), ainda que trabalhos utilizando caracterização molecular serem escassos. De fato, poucos trabalhos da América do Sul obtiveram sequências moleculares de paranfístomos de ruminantes, dentre os quais a região ITS-2 se sobressai, com amostras da Argentina e Uruguai

disponíveis para *P. leydeni*, e do Chile provenientes de *C. microbothrioides* Price & McIntosh, 1944 (Sanabria et al., 2011; Cerda et al., 2019).

O cenário de troca de rebanhos entre países e seu contato com animais silvestres, especialmente em fazendas com campos abertos, abre porta para o evento conhecido como *spillover*. Esse fenômeno é caracterizado pela troca de parasitos entre hospedeiros de diferentes espécies, sendo especialmente relevante em eventos de introdução de hospedeiros em uma nova região, permitindo que seus parasitos associados infectem animais nativos e vice-versa (Thompson, 2013; Carolus et al., 2019; Utaaker et al., 2023). Há uma forte possibilidade de que esse processo tenha ocorrido entre ruminantes nativos, como cervídeos silvestres, e o gado de produção, tendo em vista a coincidência entre os locais de origem de *P. leydeni* e *B. anastrophus* com os de ruminantes registrados infectados. A importância dessa possibilidade não pode ser menosprezada, considerando a falta de registros desses parasitos e o prejuízo que pode advir da introdução de um paranfístomo em meio a rebanhos sem exposição prévia e, conseqüentemente, sem imunidade desenvolvida para frear as infecções (González-Warleta et al., 2013; Sargison et al., 2016).

Apesar do aumento do número de estudos utilizando taxonomia integrativa para a identificação de paranfístomos, a diversidade de sequências disponíveis para diversas espécies da família ainda é baixa. O presente estudo apresenta as primeiras sequências moleculares de *B. anastrophus*, enquanto as sequências de *P. leydeni* ainda são escassas e com poucas regiões do DNA sequenciadas. Trabalhos utilizando ferramentas moleculares para uma resolução da classificação superfamília ainda estão em seus primórdios, além de pouco conhecimento sobre hospedeiros intermediários e silvestres envolvidos na manutenção desses ciclos, e de descrições morfológicas das formas larvais. Todos esses tópicos são essenciais para uma futura resolução da taxonomia, conhecimento sobre a distribuição dos parasitos e seu impacto na pecuária de diferentes países.

7. Conclusões

O estudo morfológico e molecular de amostras de paranfístomos encontrados em ruminantes de bovinos e ovinos provenientes das cidades de Jaguarão, Pelotas e Rio Grande, RS permitiram obter as seguintes conclusões:

O presente estudo forneceu os primeiros dados moleculares de *Paramphistomum leydeni* em ruminantes do Brasil.

As filogenias obtidas e a comparação das sequências com outras disponíveis no GenBank revelaram uma similaridade alta entre as amostras obtidas de *P. leydeni* e exemplares europeus, corroborando sua identificação morfológica.

As filogenias obtidas para os diferentes marcadores moleculares corroboram uma parafilía no gênero *Paramphistomum*, tendo em vista que seus representantes incluídos nas análises não formaram um grupo monofilético.

As primeiras sequências moleculares de *B. anastrophus* foram obtidas, além de sua posição filogenética ter sido avaliada a partir de diferentes regiões do DNA.

A divergência significativa entre *B. anastrophus* e outros paranfístomos parasitos de ruminantes corrobora a hipótese de que o parasitismo de ruminantes surgiu independentemente em Paramphistomidae e Balanorchiidae, tendo a primeira origem associada à Eurásia, enquanto a segunda relatada apenas no continente americano.

8. Referências

Alberto FJ, Boyer F, Orozco-Terwengel P, Streeter I, Servin B, Villemereuil P, Benjelloun B, Librado P, Biscarini F, Colli L, Barbato M, Zamani W, Alberti A, Engelen S, Stella A, Joost S, Ajmone-Marsan P, Negrini R, Orlando L, Rezaei HR, Naderi S, Clarke L, Flicek P, Wincker P, Coissac E, Kijas J, Tosser-Klopp G, Chikhi A, Bruford MW, Taberlet P, Pompanon F 2018. Convergent genomic signatures of domestication in sheep and goats. *Nature Communications* 9: 1-9.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.

Amaral VS, Sousa DF, Benigno RNM, Pinheiro RHS, Gonçalves EC, Giese EG 2020. *Cotylophoron marajoensis* n. sp. (Digenea: Paramphistomidae) a parasite of *Bubalus bubalis* on Marajó Island, Pará, Brazilian Amazon. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 29: 1-9.

Amato JFR, Velázquez-Maldonado JJ, Amato SB 1982. Infecções conjuntas de bovinos por *Balanorchis anastrophus* Fiscoeder, 1901 e *Paramphistomum* sp. (Trematoda: Paramphistomidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 42: 371-375.

Arroyo MI, Gómez L, Hernández C, Agudelo D, Galván-Díaz AL, Velásquez LE 2022. Prevalencia de *Fasciola hepatica* y Paramphistomidae en bovinos de doble propósito en una hacienda del trópico bajo andino colombiano. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* 69: 19-32.

Baptista-Farias MF, Kohn A, Miguens FC 1992. Report of *Balanorchis anastrophus* in Pará State with surface topography by scanning electron microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87 (Suppl 1): 31-35.

Barbosa FS, Pinto HA, Melo AL 2011. *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) como hospedeiro intermediário de *Zygocotyle lunata* (Trematoda: Zygocotylidae) no Brasil. *Neotropical Helminthology* 5: 241-246.

Barger I 1997. Control by management. *Veterinary Parasitology* 72: 493-506.

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

Borges FA, Almeida GD, Heckler RP, Lemes RT, Onizuka MKV, Borges DGL 2013. Anthelmintic resistance impact on tropical beef cattle productivity: Effect on weight gain of weaned calves. *Tropical Animal Health and Production* 45: 723-727.

Bowles J, Blair D, McManus DP 1995. A molecular phylogeny of the human schistosomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 103-109.

Britton JR 2013. Introduced parasites in food webs: new species, shifting structures? *Trends in Ecology & Evolution* 28: 93-99.

Cabaret J, Bouilhol M, Mage C 2002a. Managing helminths of ruminants in organic farming. *Veterinary Research* 33: 625-640.

Cabaret J, Mage C, Bouilhol M 2002b. Helminth intensity and diversity in organic meat sheep farms in centre of France. *Veterinary Parasitology* 105: 33-47.

Carmo TA, Mena MO, Cipriano IA, Favare GM, Guelpa GJ, Romão DS, Dias YS, Pinto SC, Fiho CVS, Soutello RVG 2022. Prophylaxis of helminths in cattle in Brazil. *Research, Society and Development* 11: 1-12.

Carolus H, Muzarabani KC, Hammoud C, Schols R, Volckaert FAM, Barson M, Huyse T 2019. A cascade of biological invasions and parasite spillback in man-made Lake Kariba. *Science of the Total Environment* 659: 1283-1292.

Carvalho PCF, Nabinger C, Lemaire G, Genro TCM 2009. Challenges and opportunities for

livestock production in natural pastures: the case of Brazilian Pampa Biome. In: *International Rangel Congress*, Rosario, pp. 9-15.

Cavalcante ACR, Rosa JS, Vieira LS, Pinheiro RR 1996. Infecção por *Paramphistomum* spp. em caprinos na microrregião homogênea de Sobral, Ceará. In: *EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos. Relatório técnico do Centro de Pesquisa de Caprinos: 1987-1995*, Embrapa, Sobral, pp. 195-197.

Cerda C, Veloso-Frías J, Lobos-Chávez F, Oyarzún-Ruiz P, Henríquez A, Loyola M, Silva-De La Fuente MC, Ortega R, Letelier R, Landaeta-Aqueveque C 2019. Morphological and molecular identification with frequency analysis of *Calicophoron microbothrioides* in central Chile. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 28: 582-592.

Costa HMA, Guimarães MP, Miranda MA 1990. *Cotylophoron bareilliense* Mukherjee & Chauhan, 1965 (Trematoda-Paramphistomidae). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 42: 183-186.

Costa HMA, Guimarães MP 1992. *Cotylophoron travassosi* sp. n. (Trematoda-Paramphistomidae) from cattle. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87: 69-72.

Dick M, Silva MA, Rodrigues R, Silva F, Souza JP, Geter O, Ferreira L, Souza-Maia M 2019. Impactos econômicos da condenação de carcaças bovinas no Sul do Brasil. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 27: 33-37.

Dill MD, Emvalomatis G, Saatkamp H, Rossi JA, Pereira GR, Barcellos JOJ 2015. Factors affecting adoption of economic management practices in beef cattle production in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Journal of Rural Studies* 42: 21-28.

Dinnik JA, Dinnik NN 1954. The life cycle of *Paramphistomum microbothrium* Fiscoeder, 1901 (Trematoda, Paramphistomidae). *Parasitology* 44: 285-299.

Eduardo SL 1982. The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with

special reference to the morphology of species occurring in ruminants. II. Revision of the genus *Paramphistomum* Fiscoeder, 1901. *Systematic Parasitology* 5: 189-238.

Eduardo SL 1986. The taxonomy of the family Paramphistomidae Fiscoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. VIII. The genera *Stephanopharynx* Fiscoeder, 1901 and *Balanorchis* Fiscoeder, 1901. *Systematic Parasitology* 8: 57-69.

Felsenstein J 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Fernandes BMM, Justo MCN, Cárdenas MQ, Cohen SC 2015. *South American trematodes parasites of birds and mammals*. Oficina de Livros, Rio de Janeiro. 516 pp.

Fiscoeder F 1895. Leitfaden der praktischen Fleischschau einschließlich der Trichinenschau. *Richard Schoetz*, Berlin.

Fiscoeder F 1901. Die Paramphistomiden der Saugethiere. *Zoologischer Anzeiger* 24: 367-375.

Fiscoeder F 1903. Die Paramphistomiden der Saugethiere. *Zoologische Jahrbücher Abteilung für Systematik, Geographie und Biologie der Tiere* 17: 485-660.

Fiscoeder F 1904. Weitere Mitteilungen über Paramphistomiden der Säugethiere. *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde* 35: 598-601.

Godara R, Katoch R, Yadav A, Rastogi A 2014. Epidemiology of paramphistomosis in sheep and goats in Jammu, India. *Journal of Parasitic Diseases* 38: 423-428.

González-Warleta M, Lladosa S, Castro-Hermida JA, Martínez-Ibeas AM, Conesa D, Muñoz F, López-Quílez A, Manga-González Y, Mezo M 2013. Bovine paramphistomosis in Galicia

(Spain): prevalence, intensity, aetiology and geospatial distribution of the infection. *Veterinary Parasitology* 191: 252-263.

Graber M, Euzeby JA, Gevrey JP 1980. Présence en France de *Paramphistomum leydeni* Nasmark, 1937 (Trematoda: Paramphistomata). *Annales de Parasitologie* 55: 565-569.

Hamid L, Alsayari A, Tak H, Mir SA, Almoyad MAA, Wahab S, Bader GN 2023. An insight into the global problem of gastrointestinal helminth infections amongst livestock: Does Nanotechnology provide an alternative? *Agriculture* 13: 1359.

Hotessa AS, Kanko DK 2020. Review on paramphistomosis. *Advances in Biological Research (Rennes)*. 14: 184-192.

Huson KM, Oliver NAM, Robinson MW 2017. Paramphistomosis of ruminants: an emerging parasitic disease in Europe. *Trends in Parasitology* 33: 836-844.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo agropecuário de 2017. Rio de Janeiro, 2019.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico de 2022. Rio de Janeiro, 2023.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da pecuária municipal. Rio de Janeiro, 2021

IPEA - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Carta de conjuntura, número 58, nota de conjuntura 21. Brasília, 2023.

Jackson F, Coop RL 2000. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120: S95-S107.

Jadav MM, Kumar N, Das B, Solanki JB 2018. Morphological and molecular characterization of *Paramphistomum epiclitum* of small ruminants. *Acta Parasitologica* 63: 586-594.

Jones A 2005. Family Paramphistomidae. In: Jones A, Bray RA, Gibson DI (Eds.), *Keys to Trematoda, Vol. 2*, CABI Publishing and The Natural History Museum, Londres, pp. 229-246.

Jones A 1990. Techniques for hand-sectioning thick-bodied platyhelminths. *Systematic Parasitology* 15: 211-218.

Khan I, Afshan K, Shah S, Akhtar S, Komal M, Firasat S 2020. Morphological and molecular identification of *Paramphistomum epiclitum* from buffaloes in Pakistan. *Acta Parasitologica* 65: 225-236.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549.

Lahille F, Joan T 1917. Preliminary note about a new Trematoda genus. *Physis* 3: 216-219.

Laidemitt MR, Zawadzki ET, Brant SV., Mutuku MW, Mkoji GM, Loker ES 2017. Loads of trematodes: discovering hidden diversity of paramphistomoids in Kenyan ruminants. *Parasitology* 144: 131-147.

Lampert VN, Barcellos JOJ, Neto FJK, Canellas LC, Dill MD, Canozzi MEA 2012. Development and application of a bioeconomic efficiency index for beef cattle production in Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia* 41: 775-782.

Landaeta-Aqueveque C, Henríquez AL, Cattán PE 2014. Introduced species: domestic mammals are more significant transmitters of parasites to native mammals than are feral mammals. *International Journal for Parasitology* 44: 243-249.

Laske CH, Teixeira BBM, Dionello NJL, Cardoso FF 2012. Breeding objectives and economic values for traits of low input family-based beef cattle production system in the State of Rio

Grande do Sul. *Revista Brasileira de Zootecnia* 41: 298-305.

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

Littlewood, DTJ, Olson, PD. 2001. Small subunit rDNA and the Platyhelminthes: signal, noise, conflict and compromise. In: DTJ Littlewood, RA Bray (eds.). *Interrelationships of Platyhelminthes*, CRC Press, England. 1-33 pp.

Lotfy WM, Brant SV., Ashmawy KI, Devkota R, Mkoji GM, Loker ES 2010. A molecular approach for identification of paramphistomes from Africa and Asia. *Veterinary Parasitology* 174: 234-240.

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

Ma J, He JJ, Liu GH, Zhou DH, Liu JZ, Liu Y, Zhu XQ 2015. Mitochondrial and nuclear ribosomal DNA dataset supports that *Paramphistomum leydeni* (Trematoda: Digenea) is a distinct rumen fluke species. *Parasites & Vectors* 8: 1-9.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n° 50, de 24 de Setembro de 2013.**

Marques SMT, Quadros RM, Mazzolli M, Jesus JR 2007. Parasitos gastrintestinais em veados (*Mazama gouazoubira*) de áreas nativas no planalto de Santa Catarina, Brasil. *Veterinária em Foco* 5: 5-9.

Martinez-Ibeas AM, Munita MP, Lawlor K, Sekiya M, Mulcahy G, Sayers R 2016. Rumen fluke in Irish sheep: Prevalence, risk factors and molecular identification of two paramphistome species. *BMC Veterinary Research* 12.

Mattos MJT, Ueno H 1996. Prevalência de *Paramphistomum* no rúmen e retículo de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul - Brasil. *Ciência Rural* 26: 273-276.

McTavish EJ, Decker JE, Schnabel RD, Taylor JF, Hillis DM 2013. New World cattle show ancestry from multiple independent domestication events. *PNAS* 110: 1398-1406.

Melo LRB, Sousa LC, Oliveira CSM, Lima BA, Silva ALP, Lima EF, Feitosa TF, Vilela VLR 2023. Epidemiological survey of gastrointestinal infections by gastrointestinal nematodes and coccidia in cattle in the semiarid region of Northeastern Brazil. *Semina: Ciências Agrárias* 44: 257-272.

Miranda MA, Costa HMA 1999. Report and redescription of some species of *Cotylophoron* (Trematoda: Paramphistomidae) in domestic ruminants of Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 8: 1-15.

Mirza S, Khatoon N, Bilqees FM 2009. *Paramphistomum cervi* infection in the liver of buffaloes in Karachi, Pakistan. *International Journal of Biology and Biotechnology* 6: 283-287.

Miura O, Kuris AM, Torchin ME, Hechinger RF, Dunham EJ, Chiba S 2005. Molecular-genetic analyses reveal cryptic species of trematodes in the intertidal gastropod, *Batillaria cumingi* (Crosse). *International Journal for Parasitology* 35: 793-801.

Mitchell G, Zadoks RN, Skuce PJ 2021. A universal approach to molecular identification of rumen fluke species across hosts, continents, and sample types. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 1-10.

Morley FHW, Donald AD 1980. Farm management and systems of helminth control. *Veterinary Parasitology* 6: 105-134.

Müller G, Lara SIM, Ribeiro PB 1992. Infecção natural e experimental de *Drepanotrema kermatoides* (Planorbidae) com *Paramphistomum* sp. (Fischöeder, 1901) no Rio Grande do Sul,

Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 1: 23-26

Nascimento CG, Nascimento AA, Mapeli EB, Tebaldi JH, Duarte JMB, Hoppe EGL 2006. Natural infection by Paramphistomoidea Stiles and Goldberger, 1910 trematodes in wild marsh deer (*Blastocercus dichotomus* Illiger, 1815) from Sérgio Mottas's hydroelectric power station flooding area. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 15: 133-137.

Nikander S, Saari S 2007. Notable seasonal variation observed in the morphology of the reindeer rumen fluke (*Paramphistomum leydeni*) in Finland. *Rangifer* 27: 47-57.

Oliveira DR, Ferreira DM, Stival CC, Romero F, Cavagnoli F, Kloss A, Araújo FB, Molento MB 2008. Triclabendazole resistance involving *Fasciola hepatica* in sheep and goats during an outbreak in Almirante Tamandaré, Paraná, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 17: 149-153.

Oliveira PA, Riet-Correa B, Estima-Silva P, Coelho ACB, Santos BL, Costa MAP, Ruas JL, Schild AL 2017. Multiple anthelmintic resistance Southern Brazil sheep flocks. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 26: 427-432.

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

Ortunho VV, Pinheiro RSB 2018. Prevalência das zoonoses encontradas em bovinos abatidos no estado de São Paulo de 2005 a 2015. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* 12: 303-320.

O'Toole A, Browne JA, Hogan S, Bassière T, DeWaal T, Mulcahy G, Zintl A 2014. Identity of rumen fluke in deer. *Parasitology Research* 113: 4097-4103.

Ozdam N, Gul A, Ilhan F, Deger S 2010. Prevalence of *Paramphistomum* infection in cattle and sheep in Van province, Turkey. *Helminthologia* 47: 20-24.

Padak Y, Karakuş A 2021. Molecular identification of Paramphistomidae obtained from ruminants in Van province. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 68: 223-228.

Pérez-Ponce de León G, Hernández-Mena DI 2019. Testing the higher-level phylogenetic classification of Digenea (Platyhelminthes, Trematoda) based on nuclear rDNA sequences before entering the age of the “next-generation” Tree of Life. *Journal of Helminthology* 93: 260-276.

Pinilla JC, Delgado NU, Florez AA 2019a. Prevalence of gastrointestinal parasites in cattle and sheep in three municipalities in the Colombian Northeastern Mountain. *Veterinary World* 12: 48-54.

Pinilla JC, Delgado NU, Florez AA 2019b. *Fasciola hepatica* y otras parasitosis gastrointestinales en bovinos de doble propósito del municipio Sabana de Torres, Santander, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* 30: 1240-1248.

Pinilla JC, Flórez P, Sierra M, Morales E, Sierra R, Vásquez MC, Tobon JC, Sánchez A, Ortiz D 2018a. Prevalencia del parasitismo gastrointestinal en bovinos del departamento Cesar, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* 29: 278-287.

Pinilla JC, Flórez P, Sierra MT, Morales E, Sierra R, Vásquez MC, Tobon JC, Sánchez A, Ortiz D 2018b. Point prevalence of gastrointestinal parasites in double purpose cattle of Rio de Oro and Aguachica municipalities, Cesar state, Colombia. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 12: 26-30.

Pinto HA, Melo AL 2013. Larvas de trematódeos em moluscos do Brasil: panorama e perspectivas após um século de estudos. *Revista de Patologia Tropical* 42: 369-386.

Pitt D, Sevane N, Nicolazzi EL, MacHugh DE, Park SDE, Colli L, Martinez R, Bruford MW, Orozco-terWengel P 2019. Domestication of cattle: two or three events? *Evolutionary Applications* 12: 123-136.

Ploeger HW, Ankum L, Moll L, Doorn DCK van, Mitchell G, Skuce PJ, Zadoks RN, Holzhauser M 2017. Presence and species identity of rumen flukes in cattle and sheep in the Netherlands. *Veterinary Parasitology* 243: 42-46.

Queiroz MS, Alves PV, López-Hernández D, Anjos LA, Pinto HA 2021. Exploring Neotropical anuran parasites: a morphological, life cycle and phylogenetic study of *Catadiscus marinholutzi* (Trematoda: Diplodiscidae). *Parasitology* 148: 798-808.

Rafiq N, Niaz S, Zeb I, Ayaz S, Vaz Jr IS, Ali A 2020. Molecular characterization of *Paramphistomum cervi* in buffaloes. *Acta Scientiae Veterinariae* 48: 1-7.

Rambaut A, Drummond A 2015. FigTree, ver. 1.4. 2. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Accessed Apr 2022.

Ramos F, Portella LP, Rodrigues FS, Reginato CZ, Pötter L, Cezar AS, Sangioni LA, Vogel FSF 2016. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of beef cattle in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 6: 93-101.

Rojas K, Serrano-Martínez E, Tantaleán M, Quispe M 2015. Presencia de *Cotylophoron* sp. en bovinos de la provincia de Moyobamba, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* 26: 519-524.

Ronquist F, Teslenko M, Mark P Van Der, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP 2012. MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539-542.

Salgado JA, Santos CP 2016. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 25: 3-17.

Samnaliev P, Pino LA, Bayssade-Dufour C, Albaret JL 1984. Structures argyrophiles superficielles du miracidium et de la cercaire de *Paramphistomum leydeni* Nasmark, 1937. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 59: 151-159.

Sanabria REF, Martorelli SR, Romero JR 2009. First report of *Paramphistomum leydeni* Näsmark, 1937 (Trematoda: Paramphistomidae) in Argentina, and re-examination of *Cotylophoron cotylophorum* sensu Racioppi et al. (1994). *Helminthologia* 46: 225-229.

Sanabria R, Moreno L, Alvarez L, Lanusse C, Romero J 2014. Efficacy of oxyclozanide against adult *Paramphistomum leydeni* in naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology* 206: 277-281.

Sanabria REF, Romero JR 2008. Review and update of paramphistomosis. *Helminthologia* 45: 64-68.

Sanabria REF, Moré G, Romero JR 2011. Molecular characterization of the ITS-2 fragment of *Paramphistomum leydeni* (Trematoda: Paramphistomidae). *Veterinary Parasitology* 177: 182-185.

Santos ICS, Laranja RJ, Martins JR, Ceresér VH 1986. Hospedeiro intermediário do *Paramphistomum* (Fischoeder, 1901), *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835), Guaíba, RS - Brasil. *Boletim IPVDF* 9: 19-25.

Sargison N, Francis E, Davison C, Bronsvort BMC, Handel I, Mazeri S 2016. Observations on the biology, epidemiology and economic relevance of rumen flukes (Paramphistomidae) in cattle kept in a temperate environment. *Veterinary Parasitology* 219: 7-16.

Sattmann H, Stagl V, Esberger R, Konecny R 2000. Die Geschichte der Helminthensammlung am Naturhistorischen Museum in Wien - teil 2 (1898-1998). *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie* 22: 25-32.

Schiffo HP, Lombardero OJ 1974. Mortandad de vacunos producida por *Balanorchis anastrophus*. *Gaceta Veterinaria* 36: 139-146.

Sey O 1991. *CRC Handbook of the zoology of amphistomes*. CRC Press, Londres. 480 pp.

Sindičić M, Martinković F, Strišković T, Špehar M, Štimac I, Bujanić M, Konjević D 2017. Molecular identification of the rumen flukes *Paramphistomum leydeni* and *Paramphistomum cervi* in a concurrent infection of the red deer *Cervus elaphus*. *Journal of Helminthology* 91: 637-641.

Snider JB 1986. Rumen flukes (*Paramphistomum* spp.) in moose of Northwestern Ontario. *Alces* 22: 323-344.

Stock F, Gifford-Gonzalez D 2013. Genetics and African cattle domestication. *African Archaeological Review* 30: 51-72.

Stunkard, HW 1925. The present status of the amphistome problem. *Parasitology* 17: 137-148.

Sutherland IA, Leathwick DM 2011. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends in Parasitology* 27: 176-181.

Szidat L, Ostrowski de Nuñez M 1962. Un trematode del estomago de rumiantes sudamericanos, *Balanorchis anastrophus* como cazador y predador (Paramphistomidae Balanorchinae). *Neotropica* 8: 93-99.

Teixeira JC, Hespanhol AN 2014. A trajetória da pecuária bovina brasileira. *Caderno Prudentino de Geografia* 1: 26-38.

Tessele B, Brum JS, Barros CSL 2013. Lesões parasitárias encontradas em bovinos abatidos para consumo humano. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33: 873-889.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

Thompson RCA 2013. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *International Journal for Parasitology* 43: 1079-1088.

Tkach VV, Littlewood DTJ, Olson PD, Kinsella JM, Swiderski Z 2003. Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). *Systematic Parasitology* 56: 1-15.

Travassos L 1928. Fauna helminthologica de Matto Grosso. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 21: 309-372.

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

Utaaker KS, Ytrehus B, Davey ML, Fossøy F, Davidson RK, Miller AL, Robertsen PA, Strand O, Rauset GR 2023. Parasite spillover from domestic sheep to wild reindeer - the role of salt licks. *Pathogens* 12: 1-26.

Veitenheimer-Mendes IL, Almeida-Caon JEM 1989. *Drepanotrema kermatoides* (Orbigny, 1835) (Mollusca, Planorbidae), hospedeiro de um paranfistomídeo (Trematoda), no Rio Grande do Sul, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84: 107-111.

Velázquez-Maldonado JJ 1976. Estudo taxonômico dos trematódeos paranfistomiformes do rúmen de bovinos do estado do Rio Grande do Sul - Brasil. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1976. 86 pp.

Yamaguti, S. (1971). *Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates*. Keigaku, Tokyo. Vol 1 e 2, 1074 pp.

Wiedermann S, Harl J, Fuehrer HP, Mayr S, Schmid J, Hinney B, Rehbein S 2021. DNA

barcoding of rumen flukes (Paramphistomidae) from bovines in Germany and Austria.
Parasitology Research 120: 4061-4066.