

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Marisa Caixeta Valadão

**O GÊNERO *Echinostoma* RUDOLPHI, 1809 (TREMATODA:
ECHINOSTOMATIDAE) NO BRASIL: estudo taxonômico integrativo de algumas
espécies encontradas em Minas Gerais**

Belo Horizonte

2023

Marisa Caixeta Valadão

**O GÊNERO *Echinostoma* RUDOLPHI, 1809 (TREMATODA:
ECHINOSTOMATIDAE) NO BRASIL: estudo taxonômico integrativo de algumas
espécies encontradas em Minas Gerais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Parasitologia.
Orientador: Prof. Dr. Hudson Alves Pinto
Coorientador: Prof. Dr. Philippe Vieira Alves

Belo Horizonte

2023

043

Valadão, Marisa Caixeta.

O gênero *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Trematoda: Echinostomatidae) no Brasil: estudo taxonômico integrativo de algumas espécies encontradas em Minas Gerais [manuscrito] / Marisa Caixeta Valadão. – 2023.

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

Orientador: Hudson Alves Pinto. Coorientador: Philippe Vieira Alves.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

CDU: 576.88/.89



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

TESE: 345/2023/08

TÍTULO DA TESE: "O gênero *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Trematoda: Echinostomatidae) no Brasil: estudo taxonômico integrativo de algumas espécies encontradas em Minas Gerais"

ALUNA: MARISA CAIXETA VALADÃO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: HELMINTOLOGIA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **sete de julho de 2023**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Doutores:

Dr. Hudson Alves Pinto
Orientador - UFMG

Dr. Philippe Vieira Alves
Coorientador - UNESP

Dr. Arnaldo Maldonado Júnior
Membro da banca - FIOCRUZ-RJ

Dra. Márcia Cristina Nascimento Justo
Membro da banca - FIOCRUZ-RJ

Dra. Aline Angelina Acosta
Membro da banca - University of North Carolina at Asheville

Dr. Luciano Alves dos Anjos
Membro da banca - UNESP

Belo Horizonte, 07 de julho de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Hudson Alves Pinto, Professor do Magistério Superior**, em 08/07/2023, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Philippe Vieira Alves, Usuário Externo**, em 09/07/2023, às 11:56, 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 **Aline Angelina Acosta, Usuária Externa**, em 09/07/2023, às 22:30, 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 **Márcia Cristina Nascimento Justo, Usuária Externa**, em 10/07/2023, às 08:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano Alves dos Anjos, Usuário Externo**, em 10/07/2023, às 16:27, 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 **Arnaldo Maldonado Junior, Usuário Externo**, em 11/07/2023, às 09:27, 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 **2366213** e o código CRC **CC703C79**.

À Joana, minha companheira de jornada

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha mais profunda gratidão a todos aqueles que me apoiaram direta ou indiretamente durante esta caminhada. Primeiramente agradeço a Deus por permitir encontrar pessoas nesta jornada, as quais me proporcionaram grande crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais, João e Lourdes, pelo amor incondicional e por mostrar que determinação e fé são peças-chaves na conquista de grandes objetivos. À Elisa, pela amizade, companheirismo e conforto em todos os momentos. À Fernanda, companheira de toda uma vida, que sempre me inspirou profissionalmente e não mediu esforços para que eu também conquistasse meus sonhos. À Vitória, minha afilhada, quem ilumina e preenche minha vida de alegria e orgulho.

Ao meu orientador e amigo, professor Hudson Alves Pinto, que me recebeu em seu laboratório, confiou em meu potencial e a quem devo muito do que construí nessa trajetória acadêmica até aqui. Sou eternamente grata pela oportunidade de pertencer à sua equipe e pelo incentivo diário em cada etapa para avançar na pesquisa sobre *Echinostoma*.

Ao coorientador e amigo, Philippe Vieira Alves, pelos inestimáveis comentários e conselhos que foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Ao professor e amigo, Alan Lane de Melo, com sua sabedoria e experiência e por me agradecer com os mais diversos ensinamentos, não somente na esfera profissional, mas que também levarei como aprendizado por toda a vida.

Aos meus familiares, que mesmo à distância, me incentivaram e torceram por mim em cada momento. Em especial ao meu tio Vevê (*in memoriam*), que sempre me ensinou que a “*lei de ação e reação*” nunca falha. Aos meus amigos mais próximos que entenderam minha ausência e mesmo distantes, se fizeram presentes em todos os momentos: Cayo, Marina, Lorendane, Artur, Stella, Dayana e tantos outros que preencheriam uma tese inteira se fosse citá-los. Em especial à Cláudia Maciel, que sempre me incentivou, não permitindo que eu desanimasse nos momentos difíceis durante a caminhada e quem contribuiu em grande parte desta conquista.

Às minhas colegas e amigas do Laboratório de Biologia de Trematoda, que me acompanharam nesta caminhada, tornando-a mais suave e divertida com suas palavras motivadoras e amizades. Em especial à Jordana, Danimar, Olívia, Gabrielle e Anna Clara. Também à Camila, ao Adeildo e Darlesson, que mesmo integrando a equipe recentemente, já me cativaram.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, que contribuíram significativamente para a construção do conhecimento. À Sumara e Sibeles, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, pelos prestimosos serviços.

Agradeço também aos membros da banca pela disponibilidade e valiosas contribuições.
À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Resumo

Espécies do gênero *Echinostoma* são trematódeos digenéticos que parasitam, quando adultos, o sistema digestivo de aves e mamíferos, incluindo humanos. Estes parasitos apresentam distribuição cosmopolita e mais de 100 espécies descritas, embora a taxonomia do grupo seja bastante complexa e controversa. Estudos taxonômicos integrativos realizados ao longo das últimas décadas têm revelado e fornecido hipóteses mais robustas quanto a validade dos táxons, melhorado a compreensão da real diversidade do grupo e mesmo a ocorrência de espécies crípticas neste gênero. Contudo, o cenário envolvendo *Echinostoma* spp. que ocorrem no Brasil ainda é obscuro, tendo em vista que apesar da alta riqueza de espécies nominais (cerca de 30 espécies), dados moleculares para essas espécies são praticamente inexistentes. O presente estudo teve como objetivo principal, combinar dados morfológicos e moleculares (genes nucleares: 28S e ITS; mitocondriais: *cox1* e *nad1*) de amostras de *Echinostoma* spp. obtidas de hospedeiros vertebrados e invertebrados de localidades do estado de Minas Gerais, Brasil. Para isso, exemplares adultos obtidos em vertebrados experimentalmente ou naturalmente infectado foram utilizados para descrições e comparações morfológicas a partir de montagens permanentes em lâminas. Amostras de DNA de um parasito adulto de cada espécie estudada foram utilizadas para análises filogenéticas. Os resultados obtidos neste estudo taxonômico integrativo permitiram a descrição de duas novas espécies e as sequências moleculares de outras duas espécies de *Echinostoma* já conhecidas, permitiram explorar suas relações filogenéticas. Análises moleculares da primeira espécie descrita a partir de parasitos adultos de galinha caipira naturalmente infectada no município de Viçosa, *Echinostoma pseudorobustum*, revelaram coespecificidade com cercárias previamente reportadas como *E. robustum* e subsidiaram uma discussão sobre espécies intimamente relacionadas no Novo Mundo. Parasitos adultos obtidos experimentalmente a partir de estágios larvais encontrados no molusco *S. marmorata* naturalmente infectado no município de Alvorada de Minas e as reconstruções filogenéticas baseadas em quatro loci de DNA (28S, ITS, *cox1*, *nad1*) permitiram a descoberta de uma segunda nova espécie de *Echinostoma* morfológicamente semelhante a *E. paraensei*, mas distinta geneticamente, denominada *Echinostoma maldonadoi*. A terceira espécie estudada obtida por meio de infecção experimental em canário e pombo, correspondeu bem à descrição morfológica de *E. nephrocystis* e as análises moleculares demonstraram proximidade com a espécie africana *E. caproni*, sugerindo uma possível ancestralidade entre essas espécies. Por fim, para a caracterização molecular de *E. exile*, espécie já conhecida no Brasil, uma abordagem multigênica (28S, ITS e *nad1*) avaliou a posição filogenética da espécie e, os dados obtidos não

suportaram a manutenção da espécie no gênero *Echinostoma*, sendo solicitada sua transferência para o gênero *Echinoparyphium*, com emenda na diagnose. As abordagens taxonômicas integrativas são essenciais para esclarecer aspectos sobre a diversidade de espécies de *Echinostoma* que ocorrem no Brasil e iluminar as relações filogenéticas entre elas.

Palavras-chave: *Echinostoma*; Brasil; taxonomia integrativa; sistemática filogenética.

Abstract

Species of the genus *Echinostoma* are digeneic trematodes that parasitize, as adults, the digestive system of birds and mammals, including humans. These parasites have a cosmopolitan distribution and more than 100 described species, although the taxonomy of the group is quite complex and controversial. Integrative taxonomic studies carried out over the last few decades have revealed and provided more robust hypotheses regarding the validity of the taxa, improving the understanding of the real diversity of the group and even the occurrence of cryptic species in this genus. However, the scenario involving *Echinostoma* spp. that occur in Brazil is still unclear, considering that despite the high nominal species richness (about 30 species), molecular data for these species are practically non-existent. The main objective of this study was to combine morphological and molecular data (nuclear genes: 28S and ITS; mitochondrial: *cox1* and *nad1*) from samples of *Echinostoma* spp. obtained from vertebrate and invertebrate hosts from localities in the state of Minas Gerais, Brazil. For this, adult specimens obtained from experimentally or naturally infected vertebrates were used for morphological descriptions and comparisons from permanent mounts on slides. DNA samples from one adult worm of each species studied were used for phylogenetic analyses. The results obtained in this integrative taxonomic study allowed the description of two new species and the molecular sequences of two other species of *Echinostoma* already known, allowed exploring their phylogenetic relationships. Molecular analyzes of the first species described from naturally infected free-range hen adult worms in the municipality of Viçosa, *Echinostoma pseudorobustum*, revealed co-specificity with cercariae previously reported as *E. robustum* and supported a discussion on closely related species in the New World. Adult parasites obtained experimentally from larval stages found in the mollusc *S. marmorata* naturally infected in the municipality of Alvorada de Minas and phylogenetic reconstructions based on four DNA *loci* (28S, ITS, *cox1*, *nad1*) allowed the discovery of a second new species of *Echinostoma* morphologically similar to *E. paraensei*, but genetically distinct, called *Echinostoma maldonadoi*. The third species studied, obtained through experimental infection in canary and pigeon, corresponded well to the morphological description of *E. nephrocystis* and molecular analyzes demonstrated proximity with the African species *E. caproni*, suggesting a possible ancestry between these species. Finally, for the molecular characterization of *E. exile*, a species already known in Brazil, a multigenic approach (28S, ITS and *nad1*) evaluated the phylogenetic position of the species and, the data obtained did not support the maintenance of the species in the genus *Echinostoma*, being requested its transfer to the genus *Echinoparyphium*, with

amendment in the diagnosis. Integrative taxonomic approaches are essential to clarify aspects of the diversity of *Echinostoma* species that occur in Brazil and to illuminate the phylogenetic relationships between them.

Keywords: *Echinostoma*; Brazil; integrative taxonomy; phylogenetic systematics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 a-c** *Echinostoma revolutum*, espécie-tipo. **a)** Parasito adulto; **b)** Colar cefálico armado com 37 espinhos; **c)** Bolsa do cirro. Imagens reproduzidas de Faltýnková *et al.* (2015). 20
- Figura 2 a-b** *Echinostoma revolutum*, espécie-tipo. **a)** Colar cefálico de *Echinostoma revolutum* contendo 37 espinhos em arranjo (5-6-15-6-5). Imagem reproduzida de Kostadinova (2005). **b)** Modelo com o arranjo (4-10-9-10-4) Imagem reproduzida de Kanev *et al.* (2009). 21
- Figura 3** Ciclo biológico geral de *Echinostoma* spp. Números (1-7) correspondem às fases de desenvolvimento do parasito: 1) adulto; 2) ovo; 3) miracídio; 4) esporocisto; 5) rédia; 6) cercária; 7) metacercária; e letras (a-c) correspondem aos hospedeiros: a) hospedeiros definitivos; b) primeiros hospedeiros intermediários; c) segundos hospedeiros intermediários. 22
- Figura 4** Diversidade morfológica dos colares cefálicos de alguns representantes da subfamília Echinostomatinae. Imagens reproduzidas de Dronen (2009), Kostadinova (2005), Kostadinova e Skírnisson (2007). 29
- Figura 5** Espécies de *Echinostoma* reportadas no Brasil. a) *E. alepidotum*; b) *E. aphylectum*; c) *E. barbosai*; d) *E. condignum*; e) *E. crotophagae*; f) *E. deparcum*; g) *E. discinctum*; h) *E. egregium*; i) *E. erraticum*; j) *E. exile*; k) *E. fragosum*; l) *E. lindoense*; m) *E. luisreyi*; n) *E. mendax*; o) *E. microrchis*; p) *E. necopinum*; q) *E. neglectum*; r) *E. nephrocystis*; s) *E. operosum*; t) *E. paraensei*; u) *E. parcespinosum*; v) *E. rodriguesi*; w) *E. siticulosum*; x) *E. transfretanum*; y) *E. uncatum*. 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Espécies de <i>Echinostoma</i> reportadas infectando humanos, situação taxonômica e distribuição geográfica dos casos de equinostomose.	26
Tabela 2 <i>Echinostoma</i> spp. com 37 espinhos no colar cefálico consideradas válidas por Chai <i>et al.</i> (2020) e sua distribuição geográfica.....	32
Tabela 3 Espécies de <i>Echinostoma</i> reportadas no Brasil, número de espinhos no colar cefálico, hospedeiros e referências.....	39
Tabela 4 Dados de coletas malacológicas realizadas durante o projeto em diversos municípios do estado de Minas Gerais.....	44
Tabela 5 Exemplares de <i>Echinostoma</i> spp. obtidos previamente e utilizados no presente estudo.	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

%: Porcentagem

µl: Microlitro

µm: Micrômetro

18S: Ribosomal Small Subunit

28S: Ribosomal Large Subunit

5.8S: Ribosomal RNA 5.8S

BIC: Critério de Informação Bayesiano

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

cm: Centímetro

cox1: Citocromo Oxidase Subunidade-1

d: Dia

DNA: Deoxyribonucleic Acid

doi: Digital object identifier

dpi: Dias Pós-Infecção

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

et al.: Colaboradores

h: Hora

IB: Inferência Bayesiana

ITS: Internal Transcribed Spacer

kg: Quilograma

M: Molar

mg: Miligrama

min: Minuto

ml: Mililitro

mtDNA: Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid

MV: Máxima Verossimilhança

NaCl: Cloreto de sódio

nad1: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Desidrogenase Subunidade-1

ng: Nanograma

nm: Nanômetro

°C: Graus Celsius

p. ex.: Por Exemplo

PEG: Polietilenoglicol

pmol: Picomol

rDNA: Ribossomal Deoxyribonucleic Acid

rpm: Rotações por Minuto

sp.: Uma espécie não identificada

spp.: Mais de uma espécie não identificada

syn. inq.: Synonyms for Inquiry

TRE-UFMG: Coleção de Trematódeos da Universidade Federal de Minas Gerais

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFV: Universidade Federal de Viçosa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. <i>Echinostoma</i> : morfologia.....	19
1.2. Ciclo biológico e aspectos evolutivos.....	22
1.3. Importância médica, veterinária e o uso de <i>Echinostoma</i> como modelos experimentais	24
1.4. Taxonomia e sistemática de <i>Echinostoma</i> spp: complexidade.....	28
1.4.1. O complexo <i>Echinostoma revolutum</i>	30
1.4.2. Sistemática de <i>Echinostoma</i> : histórico.....	32
1.5. Histórico de <i>Echinostoma</i> no Brasil	35
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	42
3.1. Objetivo geral	42
3.2. Objetivos específicos	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. Amostras estudadas.....	43
4.1.1. Amostras obtidas durante o projeto (2018–2020).....	43
4.1.2. Amostras previamente obtidas (1995–2012).....	45
4.2. Estudos morfológico e morfométrico	47
4.3. Estudos moleculares	49
4.3.1. Extração e quantificação de DNA.....	49
4.3.2. Amplificação	49
4.3.3. Purificação e Sequenciamento	50
4.3.4. Alinhamento	51
4.3.5. Análises filogenéticas.....	51
4.3.6. Análises de delineamento de espécies.....	52
4.3.7. Edição de árvores	52
5. RESULTADOS	53
Capítulo 1: A new species of <i>Echinostoma</i> (Trematoda: Echinostomatidae) from the ‘ <i>revolutum</i> ’ group found in Brazil: refuting the occurrence of <i>Echinostoma miyagawai</i> (= <i>E. robustum</i>) in the Americas.....	53
Capítulo 2: A new cryptic species of <i>Echinostoma</i> (Trematoda: Echinostomatidae) closely related to <i>Echinostoma paraensei</i> found in Brazil.....	66

Capítulo 3: Posição filogenética de <i>Echinostoma nephrocystis</i> : elucidando a proximidade entre espécies brasileira e africana de <i>Echinostoma</i> (Trematoda: Echinostomatidae)	78
Capítulo 4: <i>Echinostoma exile</i> (Trematoda: Echinostomatidae) revisitado: análises filogenéticas revelam sua afiliação com o gênero <i>Echinoparyphium</i>	101
CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS	124

1. INTRODUÇÃO

Os trematódeos digeneicos pertencentes ao gênero *Echinostoma* Rudolphi, 1809 são parasitos distribuídos globalmente, infectando, quando adultos, uma ampla gama de espécies de aves e mamíferos, incluindo humanos (Fried e Graczyk, 2000; Fried e Toledo, 2009). Desde a descrição da primeira espécie do gênero no início do século XIX, diversos estudos taxonômicos envolvendo este grupo de trematódeos foram realizados em todo o mundo, resultando em mais de uma centena de espécies descritas (Kanev *et al.*, 2000). Além disso, *Echinostoma* spp. têm sido foco de estudos relacionados à diferentes aspectos biológicos envolvidos nas relações parasito-hospedeiro, incluindo ciclos biológicos, comportamento dos parasitos, imunobiologia e ecologia (Fried e Graczyk, 2000; Toledo e Fried, 2005; Toledo *et al.*, 2009, 2014). Estes estudos são viáveis graças à facilidade de manutenção do ciclo de vida desses parasitos em laboratório, os quais têm sido considerados modelos experimentais ideais em todos os níveis de organização, contribuindo significativamente para o desenvolvimento e descobertas em sistemática, ultraestrutura, bioquímica, imunologia, neurobiologia, fisiologia e biologia molecular (Toledo e Fried, 2005; Toledo *et al.*, 2007). Mais recentemente na era das “ômicas”, esses trematódeos têm sido extensivamente estudados e os avanços na tecnologia de sequenciamento do genoma proporcionaram um desenvolvimento substancial, auxiliando na compreensão da diversidade e aspectos evolutivos do grupo (Fu *et al.*, 2019; International Helminth Genomes Consortium, 2019; Li *et al.*, 2019; Le *et al.*, 2020; Ran *et al.*, 2020).

Por outro lado, o uso destes organismos como modelos biológicos tem como pré-requisito uma identificação taxonômica acurada da espécie estudada. Considerando que as espécies de *Echinostoma* podem diferir em características importantes nas interações parasito-hospedeiro, o diagnóstico por meio de abordagens integrativas tem implicações importantes no desenvolvimento de medidas de controle, estudos epidemiológicos, monitoramento de zoonoses potenciais e detecção de espécies invasoras (Leung *et al.*, 2009). Nestes aspectos, a sistemática das espécies de *Echinostoma* se destaca pela sua complexidade, sobretudo das espécies que compõem o chamado complexo “*revolutum*”, que engloba a espécie-tipo *Echinostoma revolutum* (Frölich, 1802) e outras morfológicamente semelhantes que também apresentam 37 espinhos no colar cefálico (Kanev, 1994; Kostadinova *et al.*, 2003; Fried e Graczyk, 2004; Georgieva *et al.*, 2013, 2017; Faltýnková *et al.*, 2015). Estudos taxonômicos integrativos, envolvendo a caracterização morfológica detalhada associada ao uso de dados moleculares, tem

contribuído para o conhecimento destes parasitos em diferentes continentes, revelando em alguns casos a ocorrência de espécies crípticas, mas em outros a sinonimização entre espécies previamente consideradas como distintas (Kostadinova e Gibson, 2000; Esteban e Muñoz-Antoli, 2009; Georgieva *et al.*, 2014; Toledo *et al.*, 2014; Chai *et al.*, 2020).

No Brasil, apesar da riqueza de espécies de *Echinostoma* já conhecida a partir de estudos morfológicos, há escassez de dados moleculares para estes parasitos. Tendo em vista possíveis vieses em identificações e descrições prévias, resultantes entre outros fatores, da homogeneidade substancial das características morfológicas das espécies e a existência de espécies crípticas, estudos taxonômicos integrativos são necessários para elucidar a real biodiversidade relacionada a estes helmintos que ocorrem no país. Todas estas questões serão discutidas com mais detalhes a seguir.

1.1. *Echinostoma*: morfologia

Desde a primeira espécie descrita por Frölich (1802) como *Fasciola revoluta* (= *Echinostoma revolutum*), a evidência de um colar cefálico de formato reniforme na extremidade anterior do parasito é reportada, e embora este autor não tenha mencionado espinhos, notou que havia o contorno, indicando possível presença de espinhos em algum momento. Mais tarde, Rudolphi (1809) estabeleceu o gênero *Echinostoma*, caracterizado pela presença de um colar cefálico interrompido ventralmente (*caput discretum, subtus excisum. echinisque retis cinctum*) com espinhos retos e a espécie foi então realocada para este gênero (Dietz, 1910).

Do ponto de vista morfológico, as espécies do gênero *Echinostoma* possuem corpo médio a grande, alongado a alongado-oval, com largura máxima ao nível da ventosa ventral ou do útero. Tegumento armado com espinhos semelhantes a escamas mais densos até ao nível anterior da ventosa ventral. Presença de um colar cefálico bem desenvolvido com número de espinhos variando entre 31 e 55. Ventosa oral pequena e subesférica, ventosa ventral grande e muscular, próximas entre si. Bolsa do cirro anterior à ventosa ventral, contendo vesícula seminal interna simples, *pars prostatica* bem desenvolvida e cirro musculoso sem espinhos. Testículos em *tandem*, ovais-alongados, lisos, irregulares ou lobados, contíguos ou separados, apenas pós-equatoriais. Ovário equatorial ou pré-equatorial, útero com numerosas alças contendo abundantes ovos não embrionados. Vitelárias com folículos pequenos distribuídos nas áreas laterais do corpo, que podem se aproximar da linha mediana posteriormente aos testículos, mas geralmente não confluentes. Os principais caracteres tradicionalmente utilizados para identificação a

nível genérico são a morfologia do colar cefálico, dos espinhos e dos órgãos reprodutivos. Alguns parâmetros proporcionais relativos ao tamanho e largura do corpo, como comprimento da região pré-acetabular e a extensão dos campos uterino e pós-testicular, também tem sido considerados critérios taxonômicos (Kostadinova, 2005) (Figura 1).

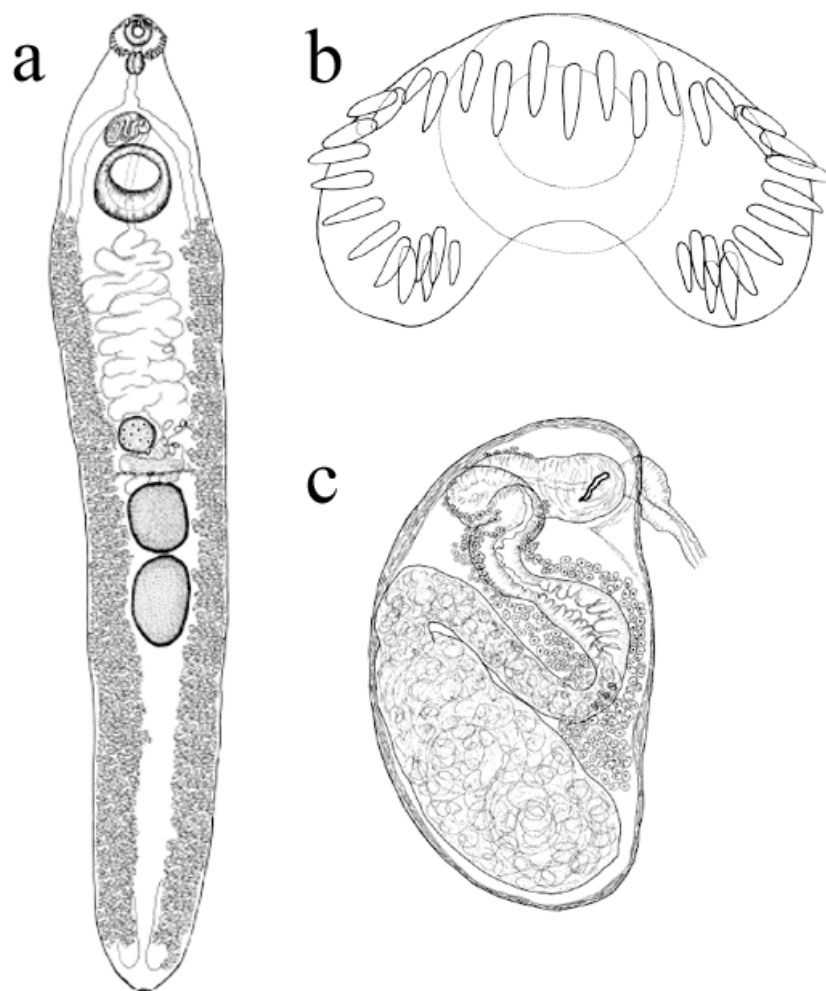


Figura 1 a-c *Echinostoma revolutum*, espécie-tipo. **a)** Parasito adulto; **b)** Colar cefálico armado com 37 espinhos; **c)** Bolsa do cirro. Imagens reproduzidas de Faltýnková *et al.* (2015).

Uma das características importantes para a identificação de espécies do gênero *Echinostoma* é a morfologia do colar cefálico e seus espinhos. A localização, número e disposição dos espinhos no colar cefálico sempre foram características importantes na taxonomia dos equinostomatídeos. Todavia, determinar com precisão o número de espinhos de uma espécie é um desafio, pois a coleta tardia de parasitos em hospedeiros naturalmente infectados e/ou erros durante a manipulação do material, podem comprometer a identificação precisa do número de espinhos no colar cefálico (Fried *et al.*, 2009). A perda ou a retração dos espinhos são, em parte, responsáveis pela literatura contraditória em relação ao número e disposição destes (Fried *et al.*, 2009; Kanev *et al.*,

2009). Usualmente, três tipos de conjuntos de espinhos são presentes: os angulares, os laterais e os dorsais. A maioria das descrições de espécies do grupo “*revolutum*” que abrange espécies com 37 espinhos no colar cefálico, consideram como padrão o arranjo de espinhos (5–6–15–6–5), sendo 5 espinhos angulares (3 orais e 2 aborais) maiores que os laterais, 6 espinhos laterais de mesmo tamanho em fileira única em cada lado e 15 espinhos dorsais em dupla fileira alternada (Figura 2).

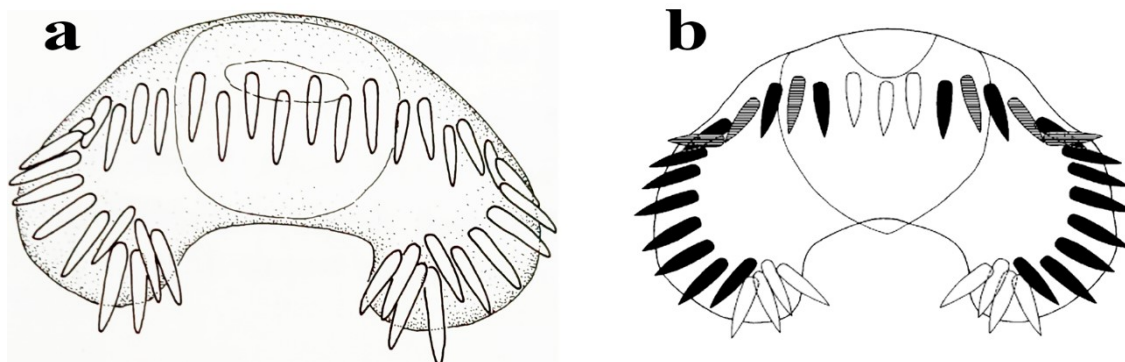


Figura 2 a–b *Echinostoma revolutum*, espécie-tipo. **a)** Colar cefálico de *Echinostoma revolutum* contendo 37 espinhos em arranjo (5-6-15-6-5). Imagem reproduzida de Kostadinova (2005). **b)** Modelo com o arranjo (4–10–9–10–4) Imagem reproduzida de Kanev *et al.* (2009).

Descrições contraditórias das contagens dos espinhos de *Echinostoma* foram discutidas por Kanev *et al.* (2009) em um estudo apresentando todos os arranjos de espinhos do colar cefálico em números ímpares (31–51), em referência aos 3 espinhos dorsais centrais no colar e 4 espinhos angulares, ao invés de 5. Os autores afirmam ainda que relatos anteriores de números e arranjos de espinhos pares eram equivocados e provavelmente refletiam espécies que haviam perdido espinhos, exibiam espinhos retraídos ou supranumerários, ou ainda que os estudos poderiam ter usado uma mistura de adultos e larvas de diferentes espécies. Essas questões relacionadas a variação morfológica no colar cefálico foram também discutidas por Fried *et al.* (2009). Embora o estudo de Kanev *et al.* (2009) tenha tentado solucionar os problemas taxonômicos sobre o número e a disposição dos espinhos do colar cefálico das espécies de *Echinostoma*, ainda não há um consenso entre os pesquisadores, e a maioria dos trabalhos recentes seguem ainda o sistema que considera a existência de 5 espinhos angulares em cada ângulo do colar, maiores que os espinhos laterais (Kostadinova, 2005).

1.2. Ciclo biológico e aspectos evolutivos

O ciclo de vida complexo de *Echinostoma* spp. envolve três categorias de hospedeiros (primeiro e segundo hospedeiros intermediários e hospedeiro definitivo) nos quais se desenvolvem estágios diferentes (adultos, miracídios, esporocistos, rédias, cercárias e metacercárias) (Kanev *et al.*, 2000; Esteban e Muñoz-Antoli, 2009). Tradicionalmente, os primeiros hospedeiros intermediários são moluscos gastrópodes aquáticos em que se desenvolvem esporocistos, rédias e cercárias. Como segundos hospedeiros intermediários, podem servir várias espécies de moluscos, anfíbios e peixes, que na maioria das vezes, compartilham o mesmo habitat (Huffman e Fried, 1990; Toledo *et al.*, 1999, 2009; Galaktionov e Dobrovolskij, 2003; Esteban e Muñoz-Antoli, 2009) (Figura 3).

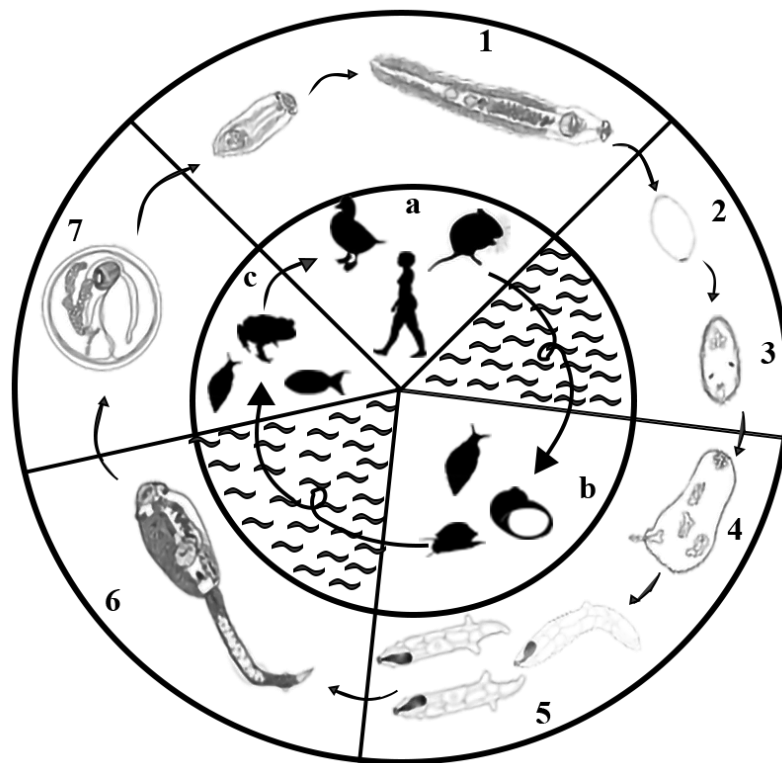


Figura 3 Ciclo biológico geral de *Echinostoma* spp. Números (1–7) correspondem às fases de desenvolvimento do parasito: 1) adulto; 2) ovo; 3) miracídio; 4) esporocisto; 5) rédia; 6) cercária; 7) metacercária; e letras (a–c) correspondem aos hospedeiros: a) hospedeiros definitivos; b) primeiros hospedeiros intermediários; c) segundos hospedeiros intermediários.

Conforme demonstrado na figura 3, o ciclo será descrito a seguir:

- I. Desenvolvimento, maturação sexual dos parasitos adultos no trato gastrointestinal do hospedeiro definitivo;
- II. Ovos são liberados juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo para o ambiente externo;

- III. Desenvolvimento dos ovos em ambiente aquático e eclosão de miracídeos em busca do primeiro hospedeiro intermediário;
- IV. Penetração dos miracídeos no primeiro hospedeiro intermediário (molusco gastrópode) e desenvolvimento de esporocistos;
- V. Desenvolvimento e multiplicação dos esporocistos intramolusco em rédias de primeira geração e gerações subsequentes que irão originar as cercárias;
- VI. Emergência das cercárias dos moluscos em meio aquático e busca pelo segundo hospedeiro intermediário;
- VII. Penetração e encistamento das cercárias (metacercárias) no segundo hospedeiro intermediário (usualmente moluscos ou anfíbios);
- VIII. Por fim, as metacercárias (formas infectantes) são transmitidas passivamente ao hospedeiro definitivo (vertebrado) pela ingestão dos segundos hospedeiros intermediários infectados, desencistadas no trato digestivo e conseqüente desenvolvimento para parasitos adultos.

A infectividade e o estabelecimento das espécies de *Echinostoma* variam bastante para cada combinação parasito-hospedeiro. Uma série de fatores como doses infectantes, estado imunológico e idade do hospedeiro e co-infecção com outros helmintos também influenciam o curso da infecção (Keeler e Huffman, 2009; Toledo, 2009). Sugere-se também que ações antrópicas nos ecossistemas aquáticos podem interferir diretamente na prevalência de infecções por *Echinostoma* spp. ou até mesmo alterar a dinâmica de populações hospedeiras (Keeler e Huffman, 2009). Os estágios de vida livre frequentemente exibem uma variedade de respostas que facilitam a localização do hospedeiro, seja por estímulos ambientais ou estímulos específicos produzidos pelo hospedeiro intermediário. Alguns estudos relatam que os padrões comportamentais desses estágios em algumas espécies de *Echinostoma* estão relacionados às adaptações evolutivas bem-sucedidas na infecção aos hospedeiros (Combes *et al.*, 1994; Haas *et al.*, 1995; Haas, 2000; Toledo *et al.*, 2007).

A composição de uma comunidade de moluscos pode ser importante para determinar a transmissão de *Echinostoma* spp. Embora anteriormente tenha sido considerado que cada espécie de *Echinostoma* infecta apenas uma ou poucas espécies de moluscos gastrópodes aquáticos intimamente relacionadas (Kanev, 1994), estudos recentes mostraram que o espectro para os primeiros hospedeiros intermediários pode ser mais amplo do que o esperado (Kostadinova *et al.*, 2000; Detwiler *et al.*, 2010; Laidemitt *et al.*, 2019; Pantoja *et al.*, 2021). Além disso, alguns trabalhos que exploraram a infectividade de cercárias em diferentes comunidades de moluscos compostas por

combinações de até quatro espécies simpátricas demonstraram que altas densidades de hospedeiros pouco compatíveis reduziam o nível de transmissão parasitária e em contraste, a presença de moluscos de alta compatibilidade contribuía para o aumento da suscetibilidade dos gastrópodes de baixa compatibilidade (Maldonado Jr *et al.*, 2001b; Toledo *et al.*, 2009).

No hospedeiro definitivo, o estágio do parasito passa por processos de excistamento, estabelecimento no sítio de infecção, desenvolvimento, reprodução e liberação de ovos (Toledo, 2009). O processo de excistamento varia entre as espécies de *Echinostoma*, sendo que em algumas, o processo é realizado através da digestão da parede do cisto por enzimas derivadas do hospedeiro e para outras, através de uma combinação de enzimas derivadas tanto do hospedeiro, quanto do parasito (Keeler e Huffman, 2009). Estudos de microscopia eletrônica de varredura e transmissão realizados em *E. trivolvis* e *E. caproni* durante excistamento *in vitro*, demonstraram que em ambas as espécies, a camada interna do cisto sofre desgaste e fragmentação em um ponto e o processo conclui quando a camada externa é rompida e a larva emerge do cisto (Irwin e Fried, 1990). Em contrapartida, as metacercárias de *E. paraensei* e *E. caproni* demonstraram diferenças específicas em termos de taxa de excistamento em meios de cultivo em laboratório e também outras características morfológicas (Fried e Reddy, 1997).

A especificidade de *Echinostoma* spp. em relação ao hospedeiro definitivo é o resultado de complexas interações parasito-hospedeiro em um processo dinâmico evolutivo conjunto (Huffman e Fried, 1990; Fried e Huffman, 1996). Além disso, os parasitos podem servir como bioindicadores, podendo fornecer informações sobre a estrutura populacional, hipóteses evolutivas, estressores ambientais, interações tróficas, biodiversidade e condições climáticas (Marcogliese, 2005).

1.3. Importância médica, veterinária e o uso de *Echinostoma* como modelos experimentais

Os helmintos adultos do gênero *Echinostoma* parasitam o intestino e ductos biliares de numerosos hospedeiros vertebrados, particularmente aves e mamíferos aquáticos ou semi-aquáticos, e também humanos (Toledo e Esteban, 2016). No entanto, recentemente foi reportado o primeiro caso de *Echinostoma* sp. na bexiga de um humano, idoso, habitante de uma área rural na China, porém sem identificar precisamente a espécie envolvida no caso (Miao *et al.*, 2021).

A baixa especificidade de algumas espécies de *Echinostoma* resulta em grande número de hospedeiros e ampla distribuição geográfica, além de uma crescente importância em zoonoses emergentes (Maldonado Jr e Lanfredi, 2009). Tendo em vista que a maioria das espécies de *Echinostoma* foram descritas a partir da infecção em animais selvagens, esses parasitos constituem um potencial risco para conservação e manejo desses animais e são importantes componentes da biodiversidade de helmintos (Maldonado Jr e Lanfredi, 2009).

Os focos de transmissão de *Echinostoma* spp. estão usualmente relacionados a habitats de água doce e devido à ampla gama de hospedeiros intermediários e a facilidade de manutenção do ciclo, mesmo sem envolvimento do humano, o ciclo de vida desses parasitos opera com eficiência na interface entre humanos, animais domésticos e selvagens (Graczyk e Fried, 1998; Maldonado Jr e Lanfredi, 2009). O diagnóstico acurado das espécies tem implicações importantes no desenvolvimento de medidas de controle, estudos epidemiológicos, monitoramento de zoonoses potenciais e detecção de espécies invasoras (Leung *et al.*, 2009).

O potencial zoonótico de *Echinostoma* spp. está associado à ingestão de moluscos, peixes, crustáceos, anfíbios ou vegetais aquáticos crus ou insuficientemente cozidos, falta de sistema de água e esgoto e utilização de fezes humanas para fertilização de tanques de peixes (Graczyk e Fried, 1998; Toledo e Esteban, 2016; Toledo *et al.*, 2022). Esses fatores são agravados por questões socioeconômicas, incluindo pobreza, desnutrição, crescente mercado de alimentos livres, falta de inspeção alimentar, saneamento precário ou insuficiente e outras helmintoses (Toledo *et al.*, 2022).

Tradicionalmente, a equinostomose tem sido considerada uma doença de menor impacto, restrita a áreas de baixa renda, principalmente no Sudeste Asiático e Extremo Oriente (Toledo e Esteban, 2016). No entanto, esse cenário está mudando e a população sob risco se expandindo atualmente devido a fatores como novos hábitos alimentares, mercados internacionais em crescimento e mudanças demográficas. Nesse contexto, mais estudos são necessários para esclarecer a epidemiologia atual dessas infecções e identificar alvos novos e específicos para diagnósticos e tratamentos eficazes (Graczyk e Fried, 1998; Toledo e Esteban, 2016; Toledo *et al.*, 2019). Diversas espécies infectando humanos foram reportadas como *Echinostoma*. Recentemente, algumas foram transferidas para outros gêneros e outras possuem identificação taxonômica duvidosa (Tabela 1).

Tabela 1 Espécies de *Echinostoma* reportadas infectando humanos, situação taxonômica e distribuição geográfica dos casos de equinostomose.

Espécie	Situação taxonômica atual	Distribuição geográfica
<i>E. aegyptiacum</i>	(= <i>Echinoparyphium recurvatum</i>)	China, República Democrática do Laos
<i>E. angustitestis</i>	(= <i>Echinochasmus angustitestis</i>)	China
<i>E. cinetorchis</i>	Espécie válida	China, Japão, Coreia do Sul
<i>E. hortense</i>	(= <i>Isthmiophora hortensis</i>)	Japão, Coreia do Sul e China
<i>E. ilocanum</i>	(= <i>Euparyphium ilocanum</i>)	Camboja, China, Filipinas, Índia, Indonésia, República Democrática do Laos
<i>E. lindoense</i>	Espécie válida	Indonésia
<i>E. malayanum</i>	(= <i>Artyfechinostomum malayanum</i>)	Camboja, Índia, Indonésia, República Democrática do Laos, Malásia, Filipinas, Cingapura, Tailândia
<i>E. macrorchis</i>	Espécie válida	Japão, Coreia do Sul, República Democrática do Laos
<i>E. mekongi</i>	Espécie válida	Camboja
<i>E. paraensei</i>	Espécie válida ¹	Brasil
<i>E. revolutum</i>	Espécie válida*	Camboja, China, Indonésia, Tailândia, Taiwan, República Democrática do Laos

Adaptada de Chai (2019); Chai e Jung (2020) e Toledo *et al.* (2022). *Diversos casos de equinostomose humana foram reportados sob o nome *E. revolutum*.

Estima-se que outras espécies de *Echinostoma* também possam demonstrar potencial zoonótico (Chai, 2019). Entretanto, o número e a identidade das espécies que atualmente causam a equinostomose humana são incertos devido à ausência de levantamentos sistemáticos, sendo a maioria das informações disponíveis baseadas em relatos de casos (Toledo e Esteban, 2016). Dentre as espécies do gênero *Echinostoma* consideradas zoonóticas, dados moleculares estão disponíveis apenas para *E. cinetorchis*,

¹ Registro de *E. paraensei* como parasito humano é incerto, uma vez não foi possível determinar se o coprólito humano mumificado encontrado no estudo de Sianto *et al.* (2005) pertencia realmente a esta espécie.

E. macrorchis, *E. mekongi*, *E. paraensei* e *E. revolutum* (National Library of Medicine, 2022).

O conhecimento sobre zoonoses do passado vem crescendo devido a avanço de estudos de paleoparasitologia, em que observam a estreita relação entre humanos e animais, verificada em registros de helmintos parasitos intestinais de animais em vestígios arqueológicos humanos. Além disso, a identificação de ovos de helmintos em coprólitos de animais também contribui para o entendimento dos parasitos causadores de zoonoses (Sianto *et al.*, 2016). Especula-se que várias zoonoses conhecidas atualmente ocorrem desde a antiguidade, e os registros aliados a estudos sobre a emergência e reemergência de doenças, podem possibilitar compor cenários para o futuro (Sianto *et al.*, 2009, 2016).

Estudos paleoparasitológicos no Brasil iniciaram com as investigações de pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) que descobriram evidência de infecção por ancilostomídeos e tricurídeos analisando múmias e coprólitos desde a década de 80 (Sianto *et al.*, 2016). Todavia, o primeiro relato de *Echinostoma* sp. foi feito a partir do encontro de ovos do trematódeo em coprólitos de um corpo humano mumificado há cerca de 600 anos antes do estudo, encontrado em um sítio arqueológico no Vale do Peruaçu, em Minas Gerais. Os coprólitos recuperados do interior da pelve foram reidratados e submetidos à técnica de sedimentação (Lutz, 1919). Os ovos encontrados foram identificados e medidos com auxílio de um microscópio ótico. Embora esforços tenham sido feitos, não foi possível obter diagnóstico específico, uma vez que a morfologia e morfometria dos ovos do gênero *Echinostoma* é inespecífica (Sianto *et al.*, 2005; Leles *et al.*, 2014).

Diante da importância médica e veterinária, os estudos utilizando *Echinostoma* spp. como modelos experimentais são cruciais para esclarecer aspectos da biologia, as complexas relações parasito-hospedeiro, estudar co-infecções e também observar a viabilidade como controladores biológicos de outras parasitoses (Maldonado Jr *et al.*, 2001c). Além disso, a facilidade de manutenção do ciclo, o custo viável e o tamanho do parasito fazem com que seja um ótimo modelo para estudo em laboratório (Fried e Huffman, 1996; Toledo e Fried 2005; Toledo *et al.* 2007; Toledo, 2009).

1.4. Taxonomia e sistemática de *Echinostoma* spp: complexidade

Kanev *et al.* (2000) sugeriram que os primeiros exemplares da família Echinostomatidae Looss, 1899 foram descritos e ilustrados na “*Biblia Naturae*” publicada no século XVIII, todavia, as investigações sistemáticas iniciaram apenas anos depois por pesquisadores europeus. Ainda que diversas espécies tenham sido descritas anteriormente e alocadas no gênero-tipo *Echinostoma*, foi Dietz (1909, 1910) quem primeiro aplicou a morfologia comparativa para estabelecer uma classificação para Echinostomatidae.

O gênero *Echinostoma* é composto por espécies de helmintos parasitos pertencentes ao filo Platyhelminthes Gegenbaur, 1859, classe Trematoda Rudolphi, 1808, subclasse Digenea Carus, 1863, superfamília Echinostomatoidea Looss, 1899 e à família Echinostomatidae. Esta família compreende um grupo bastante heterogêneo de trematódeos com distribuição geográfica cosmopolita e com diversidade taxonômica substancial, estando associados a ampla gama de hospedeiros definitivos (aves, répteis e mamíferos) (Kostadinova, 2005; Tkach *et al.*, 2016). Os membros desta família tem sido alvo de diversos estudos relacionados a taxonomia e sistemática, (Fried e Graczyk, 2000; Fried, 2001; Kostadinova e Gibson, 2000; Fried e Toledo, 2009; Tkach *et al.*, 2016), sendo *Echinostoma* certamente o grupo mais estudado.

De trinta e oito gêneros de reconhecidos como válidos em Echinostomatidae, *Echinostoma* é o gênero mais rico em espécies, com cerca de 120 espécies nominais descritas, em sua maioria parasitos de aves (Yamaguti, 1971; Kostadinova e Gibson, 2000; Chai *et al.*, 2020). Tradicionalmente, a delimitação genérica de *Echinostoma* é baseada nas características dos parasitos adultos. Outras características também têm sido amplamente utilizadas: formato do corpo determinado pela largura máxima como proporção do comprimento do corpo (BW%), a distância proporcional da extremidade anterior até ventosa ventral em relação ao comprimento do corpo (FO ou FORE%), campo uterino proporcional ao comprimento do corpo (U ou OVAR%) e distância pós-testicular proporcional ao comprimento do corpo (T ou TEND%) (Kostadinova e Gibson, 2000; Kostadinova, 2005).

Historicamente, as tentativas de explorar as relações sistemáticas dentro de Echinostomatidae iniciaram no início do século XX e que forneceram a base para futuras revisões e estabelecimento de vários sistemas de classificação. Yamaguti (1958, 1971) reorganizou a sistemática de Echinostomatidae e observou que os gêneros mais abundantes em espécies eram *Echinostoma* (gênero-tipo) e *Echinoparyphium* Dietz, 1909, uma vez que contavam com um grande número de espécies morfologicamente

semelhantes, características comuns como distribuição cosmopolita e utilização de uma ampla gama de hospedeiros (intermediários e definitivos). Isso foi corroborado décadas depois em uma estimativa de espécies desses gêneros feita por Kostadinova e Gibson (2000).

Até recentemente, *Echinostoma*, juntamente com 18 gêneros: *Bashkirovitrema* Skjarabin, 1944; *Drepanocephalus* Dietz, 1909; *Echinodollfusia* Skjarabin e Bashkirova, 1956; *Echinoparyphium*; *Euparyphium* Dietz, 1909; *Hypoderaeum* Dietz, 1909; *Isthmiophora* Lühe, 1909; *Longicollia* Bykhovskaya-Pavlovskaya, 1954; *Lyperorchis* Travassos, 1921; *Moliniella* Hübner, 1939; *Neocanthoparyphium* Yamaguti, 1958; *Pameileenia* Wright e Smithers, 1956; *Parallelotestis* Belopol'skaya, 1954; *Paryphostomum* Dietz, 1909; *Petasiger* Dietz, 1909; *Prionosoma* Dietz, 1909; *Prionosomoides* Freitas e Dobbin, 1967 e *Singhia* Yamaguti, 1958 compunham a subfamília Echinostomatinae com uma morfologia diversificada do colar cefálico (Kostadinova, 2005; Esteban e Muñoz-Antoli, 2009) (Figura 4).

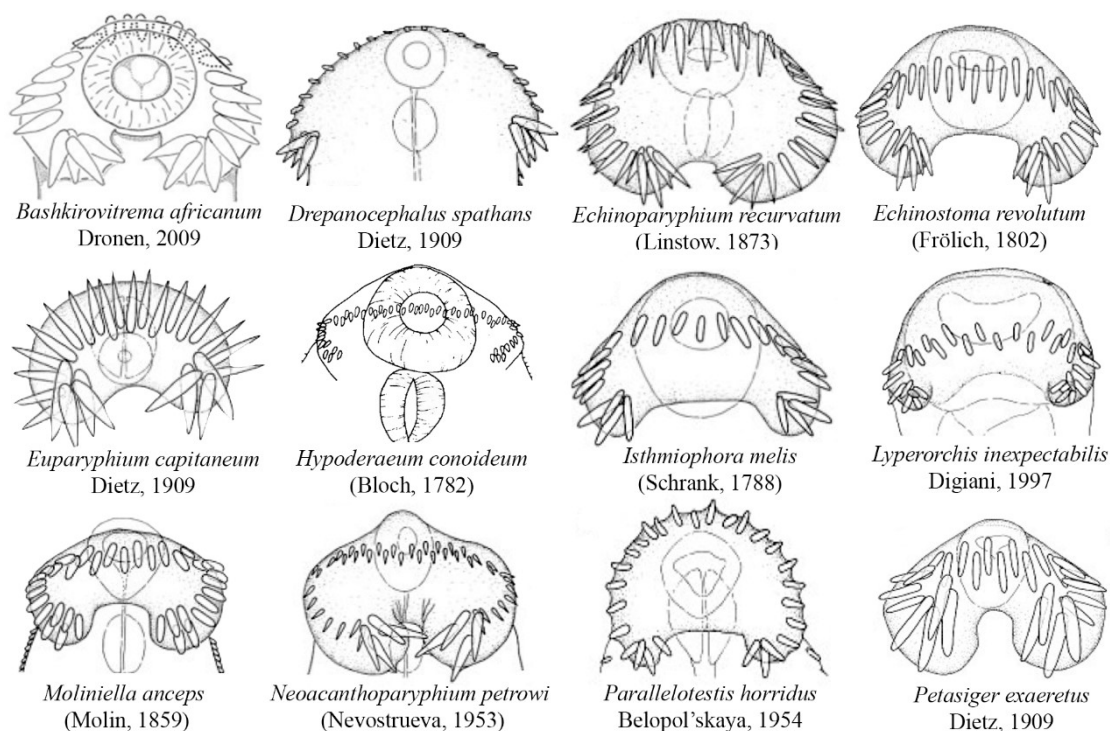


Figura 4 Diversidade morfológica dos colares cefálicos de alguns representantes da subfamília Echinostomatinae. Imagens reproduzidas de Dronen (2009), Kostadinova (2005), Kostadinova e Skírnisson (2007).

Recentemente, Tkach *et al.* (2016) forneceram a primeira filogenia abrangente e fizeram uma série de mudanças sistemáticas e nomenclaturais consistentes com as estimativas filogenéticas dos limites genéricos e supragenéricos de Echinostomatidae. Avaliaram a consistência atual do sistema de classificação baseado em morfologia com

as relações filogenéticas para uma ampla diversidade de táxons e alteraram o diagnóstico familiar de Echinostomatidae fornecido anteriormente por Kostadinova (2005). O resultado mais importante desse estudo demonstrou que Echinostomatidae era um táxon polifilético, dividido em três grandes clados, sendo o maior deles, [Echinostomatidae (s. str.)], composto por 11 gêneros representantes da antiga subfamília Echinostomatinae e mais 6 gêneros anteriormente alocados em outras subfamílias.

A morfologia é a pedra angular da sistemática, entretanto as abordagens moleculares têm sido fundamentais na busca de um sistema de classificação estável do gênero *Echinostoma* e no estabelecimento de limites de espécies, permitindo a reconstrução de filogenias robustas e uma compreensão mais profunda dos padrões de especiação (Kostadinova e Pérez-del-Olmo, 2019; Pérez-Ponce de León e Hernández-Mena, 2019). A uniformidade morfológica e a diferença dos critérios adotados por diferentes autores, resultaram na complexidade taxonômica de *Echinostoma*. Além disso, a perda ou inacessibilidade do material-tipo ou espécime representativo depositado em coleções helmintológicas representa um empecilho adicional, uma vez que impede o reexame da espécie (Kostadinova e Gibson, 2000; Kostadinova, 2005). Tal confusão é evidenciada principalmente no grupo de espécies conhecido como “*revolutum*”, que possuem características morfológicas e ecológicas similares (Kostadinova e Gibson, 2000; Esteban e Muñoz-Antoli, 2009).

É importante ressaltar que estudos moleculares não substituem os estudos morfológicos. As informações valiosas que são obtidas a partir de análises moleculares devem ser interpretadas em um contexto holístico, a fim de aumentar a informação biológica total (Blasco-Costa *et al.*, 2016). Utilizar apenas a informação genética, sem, contudo, fornecer evidências para uma avaliação comparativa posterior de *Echinostoma* torna laborioso o avanço de estudos que buscam elucidar as relações taxonômicas dentro do grupo (Georgieva *et al.*, 2013, 2014; Pantoja *et al.*, 2021).

1.4.1. O complexo Echinostoma revolutum

As espécies ou linhagens de *Echinostoma* que possuem 37 espinhos no colar cefálico compreendem o grupo ou complexo “*revolutum*”, em referência à espécie-tipo *E. revolutum* e qualificam-se como espécies crípticas devido à homogeneidade interespecífica dos caracteres usados para diferenciar as espécies (Kostadinova e Gibson, 2000; Detwiler *et al.*, 2010; Georgieva *et al.*, 2013, 2014; Chai *et al.*, 2020). Esse

complexo de espécies já foi alvo de diversas revisões ao longo dos anos por Beaver (1937), Kanev (1994), Georgieva *et al.* (2014) e Chai *et al.* (2020).

Beaver (1937) classificou a espécie-tipo como única espécie polimórfica (sinonimizando 9 espécies) e considerou outras 11 espécies como “*syn. inq.*” (possivelmente espécies sinônimas, porém inadequadamente descritas ou distintas). Posteriormente, Kanev (1994) delimitou 5 espécies pertencentes ao grupo “*revolutum*” distintas por características como diferenças nas preferências de hospedeiros intermediários e definitivos, características de desenvolvimento e regiões geográficas: *E. revolutum*, *Echinostoma echinatum* (Zeder, 1803) e *Echinostoma jurini* (Skvortsov, 1924) da Europa e Ásia, *E. trivolvis* da América do Norte e *E. caproni* da África.

Embora o esquema de distribuição geográfica das espécies de *Echinostoma* em escala continental proposto por Kanev (1994) tenha sofrido alterações ao longo dos anos, o avanço dos estudos moleculares permitiu elucidar maior diversidade dentro do complexo de espécies “*revolutum*” do que se imaginava anteriormente. Nas últimas décadas, novos representantes do complexo de espécies foram registrados e o auxílio das ferramentas moleculares disponíveis atualmente tem possibilitado esclarecer hipóteses filogenéticas e favorecer a delimitação de espécies (Georgieva *et al.*, 2014).

Por fim, recentemente, uma revisão histórica da descoberta e debates taxonômicos sobre 26 espécies pertencentes ao grupo “*revolutum*”, sendo algumas destas com validade taxonômica a ser esclarecida foi publicada (Chai *et al.*, 2020). No contexto atual, os pesquisadores buscam esclarecer essa confusão taxonômica do grupo, considerando as características genéticas e fenotípicas de *Echinostoma* utilizando uma abordagem integrativa (Sorensen *et al.*, 1998; Esteban e Muñoz-Antoli, 2009; Chai *et al.*, 2020). As espécies consideradas válidas na última revisão taxonômica e sua distribuição geográfica em escala continental são demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2 *Echinostoma* spp. com 37 espinhos no colar cefálico consideradas válidas por Chai *et al.* (2020) e sua distribuição geográfica.

Espécie	Distribuição geográfica
<i>Echinostoma bolschewense</i>	República Checa, República Eslovaca, Rússia
<i>Echinostoma caproni</i>	Camarões, Congo, Egito, Madagascar, Togo
<i>Echinostoma cinctorchis</i>	China, Coreia do Sul, Indonésia, Japão, Taiwan, Vietnã
<i>Echinostoma deserticum</i>	Algéria, Níger
<i>Echinostoma lindoense</i> *	Brasil, Filipinas, Indonésia, Malásia, Tailândia
<i>Echinostoma luisreyi</i> *	Brasil
<i>Echinostoma mekongi</i>	Camboja
<i>Echinostoma miyagawai</i> ^a	Alemanha ^a , Áustria, Bangladesh ^a , Bulgária, Brasil ^a , China, Coreia do Sul, Espanha, Estados Unidos ^a , Hungria, Japão, Polônia, Reino Unido ^a , República Democrática do Laos, República Checa, Rússia, Tailândia, Ucrânia, Uzbequistão ^a , Vietnã, Taiwan ^a , Nova Zelândia
<i>Echinostoma nasincovae</i>	República Checa, República Eslovaca
<i>Echinostoma novaezealandense</i>	Nova Zelândia
<i>Echinostoma paraensei</i> *	Brasil, Austrália
<i>Echinostoma paraulum</i>	Alemanha, Áustria, Bangladesh, China, Paquistão, República Checa, Rússia
<i>Echinostoma revolutum</i> *	Cosmopolita (exceto continente africano)
<i>Echinostoma</i> sp. IG	Alemanha, Islândia, Reino Unido
<i>Echinostoma trivolvis</i>	Canadá, Estados Unidos

^a Inclui registros como *E. robustum*. Espécies já reportadas no Brasil são assinaladas por *.

1.4.2. Sistemática de *Echinostoma*: histórico

Durante a “era pré-molecular” a distinção entre as espécies do gênero *Echinostoma* baseava-se em abordagens comparativas de caracteres morfológicos dos adultos. Consequentemente, o gênero ainda é alvo de revisões contínuas que adicionam novas espécies e/ou sinonimizam outras, e mesmo com o progresso obtido nos últimos anos, a sistemática desse gênero permanece controversa (Kostadinova e Gibson, 2000; Kostadinova *et al.*, 2003; Fried e Graczyk, 2004; Georgieva *et al.*, 2014; Faltýnkova *et al.*, 2015; Chai *et al.*, 2020).

Estudos recentes têm demonstrado que alguns trematódeos digenéticos previamente identificados como espécies únicas devido à falta de distinção entre suas características morfológicas, na verdade consistem em um número de espécies geneticamente distintas (Leung *et al.*, 2009). Espécies crípticas são definidas como duas ou mais linhagens distintas que são classificadas como uma única espécie devido à ausência de diferenças morfológicas conspícuas, principalmente nos adultos já que estágios larvais (p. ex. cercária) carecem de caracteres diferenciais presentes nas formas adultas em seus hospedeiros definitivos (Bickford *et al.*, 2007; Detwiler *et al.*, 2010).

O reconhecimento dessas espécies crípticas tem implicações em estudos evolutivos e populacionais contribuindo para um melhor entendimento sobre a diversidade em *Echinostoma* (Detwiler *et al.*, 2010). Contudo, Pérez-Ponce de León e Nadler (2010) ponderaram que espécies crípticas são provisoriamente enigmáticas na medida em que estudos morfológicos adicionais ou a aplicação de novas técnicas podem revelar diferenças estruturais diagnósticas anteriormente desconhecidas, permitindo um diagnóstico morfológico rápido e prático; nestes casos, essas espécies podem ser enquadradas no conceito de “pseudocrípticas” (Lajus *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de abordagens moleculares foi fundamental para descoberta e documentação de espécies, uma vez que permitiu que pequenas quantidades de regiões específicas do material genético do parasito fossem amplificadas (Morgan e Blair, 2000; Nadler e Pérez-Ponce de León, 2011). O uso dessas ferramentas na taxonomia e classificação de *Echinostoma* spp. coincide com os primeiros esforços de determinação das relações filogenéticas em Digenea utilizando os marcadores nucleares ribossomais, principalmente as subunidades maiores e menores do rDNA (18S e 28S) (Cribb *et al.*, 2001; Olson *et al.*, 2003).

Recentemente, Pérez-Ponce de León e Hernández-Mena (2019) concluíram que 28S é o marcador molecular com maior representatividade de sequências e fornece um bom sinal filogenético para resolver relações entre grupos-irmãos, tanto ao nível de espécie e gênero, como entre táxons superiores. Enquanto 28S tem sido bastante utilizado para inferir relações em níveis taxonômicos superiores, os espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) separados pelo gene 5.8S, juntamente com os genes mitocondriais (*cox1* e *nad1*) têm sido utilizados afim de explorar níveis inter ou intraespecífico (Blasco-Costa *et al.*, 2016; Kostadinova e Pérez-del-Olmo, 2019).

Particularmente dentro do gênero *Echinostoma*, os problemas de identificação de espécies caíram em duas categorias: *i*) identificação errônea, especialmente entre espécies com 37 espinhos no colar cefálico (*E. revolutum*, *E. caproni* e *E. trivolvis*); e *ii*) descrições de isolados como novas espécies, que posteriormente se tornaram sinônimos juniores de espécies conhecidas (Morgan e Blair, 2000). O primeiro estudo molecular do problemático grupo “*revolutum*”, feito há quase 3 décadas, encontrou níveis muito baixos de variação entre sequências interespecíficas para os marcadores nucleares de espaçadores transcritos internos (ITS) (1,1–3,7%) de isolados de *Echinostoma* mantidos em laboratório (Morgan e Blair, 1995). Posteriormente, esses mesmos autores obtiveram sequências dos genes *cox1* (citocromo oxidase 1) e *nad1* (nicotinamida adenina dinucleotídeo 1) desses isolados e revelaram que dentre esses genes mitocondriais, *nad1*

fornecia melhor resolução na discriminação das espécies em comparação com ITS e *cox1* (Morgan e Blair, 1998b; Esteban e Muñoz-Antoli, 2009; Georgieva *et al.*, 2014).

Uma década depois, Vilas *et al.* (2005) avaliaram a utilidade dos marcadores mitocondrial (*nad1*) e nuclear (ITS) na prospecção de espécies crípticas de platelmintos parasitos e encontraram que o grau de variação interespecífica seria aproximadamente 1% em ITS e maior que 5% em *nad1* e variações intraespecíficas avaliadas entre espécies de *Echinostoma* estudadas seria em torno de 0,3 a 2,2%. Embora haja um consenso que mais esforços são necessários para obter melhor representação da diversidade taxonômica em filogenias moleculares, ainda hoje existem desafios na seleção dos locos gênicos mais adequados a cada análise (Kostadinova e Pérez-del-Olmo, 2019).

Mesmo com o avanço nos estudos que utilizam sequências de DNA mitocondrial afim de estabelecer limites de espécies/linhagens, os genes nucleares ainda são a base da sistemática molecular (Pérez-Ponce de León e Hernández-Mena, 2019). Blasco-Costa *et al.* (2016) ressaltam a importância de “melhores práticas” nas abordagens moleculares da sistemática de trematódeos, recomendando o uso combinado dos genes ribossômico e mitocondrial. Sugerem ainda explorar a variação no nível intraespecífico com um gene mitocondrial (*nad1* ou *cox1*) e usar uma região variável nuclear como a ITS ou 28S para corroborar variações interespecíficas para grupos taxonômicos inferiores.

O termo “taxonomia integrativa” deve ser interpretado como abordagem holística que visa a possibilidade de iluminação recíproca sobre as origens, limites e evolução das espécies, com a utilização de caracteres diversos (ecológicos, comportamentais, biológicos, morfológicos, genéticos, etc). Tendo em vista que a identificação taxonômica usando apenas dados morfológicos pode ser problemática, os dados moleculares podem revelar diferenças genéticas ocultas que podem então ser usadas para delimitar espécies morfológicamente semelhantes, mas geneticamente distintas (Nadler e Pérez-Ponce de León, 2011). A taxonomia baseada em DNA não deve ser considerada substituta da taxonomia baseada em morfologia, mas sim como um complemento, afim de aumentar as informações biológicas disponíveis (Blasco-Costa *et al.*, 2016).

Em níveis taxonômicos superiores (acima de espécie), dados genéticos podem ainda informar sobre a utilidade de determinados caracteres morfológicos utilizados comumente na classificação tradicional baseada apenas na morfologia. A caracterização molecular também pode revelar entidades evolutivas discretas, mas indistinguíveis morfológicamente, ou seja, que apresentam grande plasticidade fenotípica. Considerando a importância da identificação acurada de espécies de *Echinostoma*, abordagens integrativas baseadas em dados moleculares, morfológicos e biológicos são fundamentais

para identificações taxonômicas mais robustas, podendo mesmo resultar na descrição de novas espécies.

1.5. Histórico de *Echinostoma* no Brasil

Durante sua viagem ao Brasil (1817–1835), Johann Natterer coletou espécimes de *Echinostoma* em vários hospedeiros definitivos, e os enviou ao Museu de História Natural de Viena (Áustria). Esses helmintos posteriormente foram descritos por Dietz (1909, 1910), sendo as primeiras espécies de *Echinostoma* reportadas no Brasil. Nesta mesma época, Gomes de Faria (1909) também reportou o encontro de 6 exemplares de uma espécie que ele denominou de *Echinostoma crotophagae* parasitando o intestino de *Crotophaga major* Gmelin, 1788.

Os primeiros estudos experimentais foram realizados por Lutz (1924), que descreveu 6 novas espécies: *Echinostoma erraticum*, *Echinostoma exile*, *Echinostoma microrchis*, *Echinostoma neglectum*, *Echinostoma nephrocystis* e *Echinostoma parcespinosum*, sendo a maioria delas obtidas a partir da infecção experimental de aves (hospedeiros definitivos) e algumas delas permanecem sem hospedeiros naturais conhecidos.

Beaver (1937) apresentou o estudo mais completo até então sobre a morfologia e biologia de *Echinostoma* e seu estudo foi seguido por vários pesquisadores durante muitos anos de investigações sobre a morfologia e o ciclo de vida de outros membros do gênero (Toledo *et al.*, 2004). Foi o primeiro pesquisador a sugerir a hipótese de polimorfismo das espécies que ele identificou como *E. revolutum* (atualmente tratada como *E. trivolvis*) e destacou que 4 espécies relatadas no Brasil por Lutz (1924), *E. erraticum*, *E. neglectum*, *E. microrchis* e *E. nephrocystis* possuíam validade taxonômica incerta e poderiam ser idênticas à espécie reportada por ele.

Outras quatro espécies foram descritas a partir de estágios larvais de moluscos coletados no Brasil e adultos obtidos experimentalmente nos Estados Unidos: *E. barbosai*, *E. lindoense*, *E. paraensei* e *E. rodriguesi* (Lie e Basch, 1966, 1967; Hsu *et al.*, 1968; Lie, 1968). Além de contribuir significativamente para o conhecimento de ciclos biológicos, algumas dessas espécies foram utilizadas em estudos interações sinérgicas e antagônicas intra e interespecíficas, relações parasito-hospedeiro, incluindo o registro de novas espécies sul-americanas (Kanev *et al.*, 2000; Toledo *et al.*, 2004).

Posteriormente, Kohn e Fernandes (1975) redescreveram as espécies *E. erraticum*, *E. exile*, *E. microrchis*, *E. neglectum*, *E. nephrocystis* e *E. parcespinosum*

descritas por Lutz (1924), a partir do material depositado na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC). Novas pranchas de desenhos e análise morfométrica detalhada (ausentes na descrição original) foram fornecidas. Os autores sugerem que desde a época da descrição original, o material previamente reportado como *E. nephrocystis*, *E. microrchis* e *E. neglectum* poderiam representar uma coleção de mais de uma espécie. A partir desta revisão, Kostadinova e Gibson (2000) em seu estudo sistemático sobre as espécies do grupo “*revolutum*”, ressaltaram que as formas possuindo 37 espinhos no colar cefálico e identificadas como *E. erraticum*, *E. nephrocystis*, *E. microrchis* e *E. neglectum* exibiam diferenças morfológicas significativas, sugerindo a validade taxonômica destas espécies. Estas espécies foram consideradas válidas também nas revisões realizadas por Travassos *et al.* (1969), Yamaguti (1971), Thatcher (1993) e Fernandes *et al.* (2015).

No início dos anos 2000, grandes avanços no estudo de *Echinostoma* no Brasil foram obtidos com os trabalhos de Maldonado Jr. e colaboradores. Entre estes, o hospedeiro natural de *E. paraensei*, o rato-d’água *Nectomys squamipes* (Brants, 1827), foi reportado no município de Sumidouro, Rio de Janeiro (Maldonado Jr *et al.*, 2001a). Dados morfológicos (microscopia de luz e de varredura) e moleculares do espécime mantido em laboratório há mais de 3 décadas e do espécime recém-isolado do hospedeiro naturalmente infectado foram disponibilizados. Em um outro trabalho, foram avaliados aspectos biológicos dos espécimes recentemente obtidos e a suscetibilidade de moluscos simpátricos como hospedeiros intermediários e outros roedores como hospedeiros vertebrados definitivos (Maldonado Jr *et al.*, 2001b). Ainda no mesmo ano, Maldonado Jr *et al.* (2001c) estudaram os efeitos antagônicos da co-infecção entre *E. paraensei* e *Schistosoma mansoni* (Sambom, 1907) em *N. squamipes* e demonstraram que *E. paraensei* regulava a intensidade do parasitismo provocado por *S. mansoni*. Nos anos seguintes, Maldonado Jr *et al.* (2003) descreveram uma nova espécie de *Echinostoma* (*Echinostoma luisreyi*) pertencente ao grupo “*revolutum*”, parasito de mamíferos, obtido a partir de estudo experimental de cercárias em *Stenophysa marmorata* (Guilding, 1828) naturalmente infectado. Em outro estudo que foram avaliados o comportamento biológico e dados morfométricos de 2 isolados alopatricos de *E. paraensei* (Rio Bonito e Sumidouro) obtidos de *N. squamipes*, permitiram a Maldonado Jr *et al.* (2005) sugerirem que o grau de variação intraespecífica nos parâmetros biológicos observados entre os espécimes poderia ser resultado do isolamento geográfico e, em particular, das condições ambientais de transmissão. Além disso, levantaram a questão sobre a validade do uso desses critérios para diferenciação das espécies de *Echinostoma*.

Após mais de um século de estudos, mais de 25 espécies pertencentes ao gênero *Echinostoma* foram reportadas no Brasil (Figura 5).

Na Tabela 3 são apresentadas as informações disponíveis para as representadas na figura 5. Apesar dessa riqueza substancial de espécies de *Echinostoma* reportadas no país, há escassez de dados moleculares para as mesmas. Além disso, a carência de uma chave taxonômica baseada em critérios inequívocos dificulta a identificação correta de espécies, influenciando nas estimativas de especificidade aos hospedeiros, diversidade e distribuição geográfica.

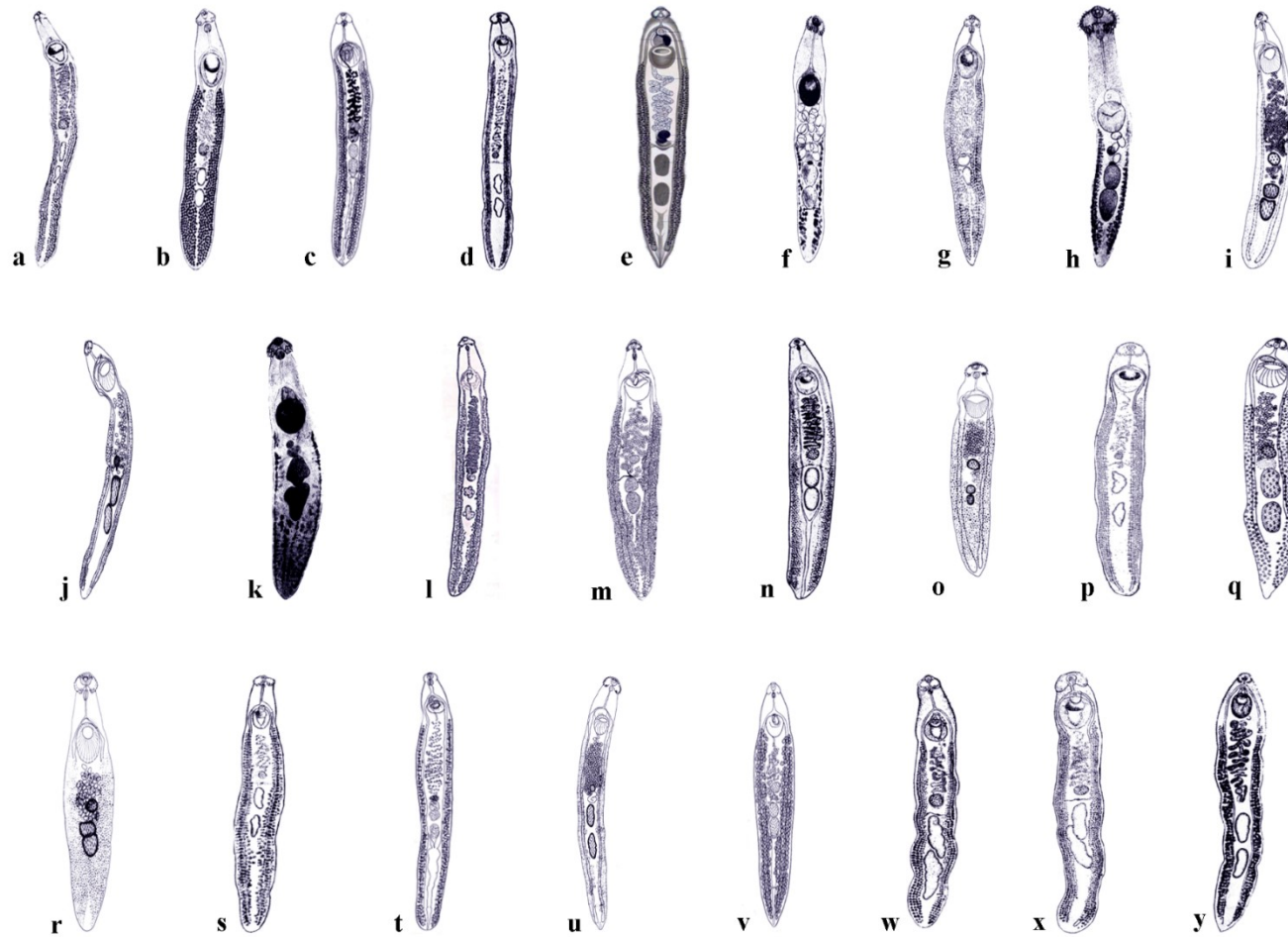


Figura 5 Espécies de *Echinostoma* reportadas no Brasil. a) *E. alepidotum*; b) *E. aphy lactum*; c) *E. barbosa*; d) *E. condignum*; e) *E. crotophagae*; f) *E. deparcum*; g) *E. discinctum*; h) *E. egregium*; i) *E. erraticum*; j) *E. exile*; k) *E. fragosum*; l) *E. lindoense*; m) *E. luisreyi*; n) *E. mendax*; o) *E. microrchis*; p) *E. necopinum*; q) *E. neglectum*; r) *E. nephrocystis*; s) *E. operosum*; t) *E. paraensei*; u) *E. parcespinosum*; v) *E. rodriguesi*; w) *E. siticulosum*; x) *E. transfretanum*; y) *E. uncatum*.

Tabela 3 Espécies de *Echinostoma* reportadas no Brasil, número de espinhos no colar cefálico, hospedeiros e referências.

Espécie	Nº de espinhos no colar cefálico	Hospedeiros definitivos	Moluscos transmissores	Referências
<i>Echinostoma alepidotum</i> Dietz, 1909	41	Ave ^N	Desconhecido	Dietz, 1909
<i>Echinostoma aphyllactum</i> Dietz, 1909	39	Ave ^N	Desconhecido	Dietz, 1909; Avancini, 2009
<i>Echinostoma barbosai</i> Lie & Basch, 1966	37	Aves*	<i>Biomphalaria glabrata</i> ^{N*} ; <i>B. tenagophila</i> ^{N*} ; <i>B. straminea</i> *	Lie e Basch, 1966
<i>Echinostoma condignum</i> Dietz, 1909	49	Aves ^N	Desconhecido	Dietz, 1909
<i>Echinostoma crotophagae</i> Gomes de Faria, 1909	32–36	Ave ^N	Desconhecido	Gomes de Faria, 1909
<i>Echinostoma deparcum</i> Dietz, 1909	24	Ave ^N	Desconhecido	Dietz, 1910
<i>Echinostoma distinctum</i> Dietz, 1909	35	Ave ^N	Desconhecido	Dietz, 1910
<i>Echinostoma egregium</i> Dietz, 1909	31	Ave ^N	Desconhecido	Dietz, 1909
<i>Echinostoma erraticum</i> Lutz, 1924	36–39	Ave ^{N*}	<i>Physa</i> ^N ; <i>Planorbis</i> ^N	Lutz, 1924; Komma, 1972; Kohn e Fernandes, 1975
<i>Echinostoma exile</i> Lutz, 1924	43–45	Aves*	<i>Stenophysa marmorata</i> ^N ; <i>B. glabrata</i> *	Lutz, 1924; Kohn e Fernandes, 1975; Pinto e Melo, 2012
<i>Echinostoma fragosum</i> Dietz, 1909	27	Ave ^N	Desconhecido	Dietz, 1909
<i>Echinostoma lindoense</i> Sandground & Bonne, 1940	37	Ave*; mamífero*	<i>B. glabrata</i> ^{N*}	Lie, 1968
<i>Echinostoma luisreyi</i> Maldonado Jr, Vieira & Lanfredi, 2003	36–38	Mamíferos*	<i>S. marmorata</i> ^{N*} ; <i>B. glabrata</i> *	Maldonado Jr <i>et al.</i> , 2003

<i>Echinostoma mendax</i> Dietz, 1909	37	Ave*	Desconhecido	Dietz, 1909; Lutz, 1924
<i>Echinostoma microrchis</i> Lutz, 1924	37	Aves ^N	Desconhecido	Lutz, 1924; Kohn e Fernandes, 1975
<i>Echinostoma necopinum</i> Dietz, 1909	47	Aves ^N	Desconhecido	Dietz, 1909
<i>Echinostoma neglectum</i> Lutz, 1924	37–45	Ave*	moluscos dulcícolas ^N	Lutz, 1924; Kohn e Fernandes, 1975
<i>Echinostoma nephrocystis</i> Lutz, 1924	30–42	Aves*	<i>Physa</i> sp. ^N	Lutz, 1924; Kohn e Fernandes, 1975
<i>Echinostoma operosum</i> Dietz, 1909	33	Ave ^N		Dietz, 1909
<i>Echinostoma paraensei</i> Lie & Basch, 1967	36–37	Mamíferos ^{N*}	<i>B. glabrata</i> ^{N*} ; <i>B. straminea</i> *; <i>Physella acuta</i> *	Lie e Basch, 1967; Maldonado Jr. <i>et al.</i> , 2001a
<i>Echinostoma parcespinosum</i> Lutz, 1924	27–33	Aves*	<i>Pomacea linnaei</i> ^N ; <i>B. glabrata</i> ^N	Lutz, 1924; Kohn e Fernandes, 1975; Machado e Sampaio, 1980
<i>Echinostoma robustum</i> Yamaguti, 1935	37	Ave*	<i>B. glabrata</i> ^N ; <i>Ladislavella elodes</i> *	Detwiler <i>et al.</i> , 2010
<i>Echinostoma rodriguesi</i> Hsu, Lie & Basch, 1968	37	Aves*; mamíferos*	<i>P. acuta</i> ^{N*} ; <i>B. glabrata</i> *	Hsu <i>et al.</i> , 1968
<i>Echinostoma siticulosum</i> Dietz, 1909	41–45	Aves ^N	Desconhecido	Dietz, 1909
<i>Echinostoma transfretanum</i> Dietz, 1909	51	Ave ^N	Desconhecido	Dietz, 1909
<i>Echinostoma uncatum</i> Dietz, 1909	32–36	Aves ^N	Desconhecido	Dietz, 1909
<i>Echinostoma</i> sp. ¹	36–38	Aves ^{N*} ; Mamíferos ^{N*}	<i>Physa</i> sp. ^N ; <i>Planorbis</i> ^N ; <i>B. tenagophila</i> ^{N*}	Lutz, 1924; Mello, 1933; Travassos <i>et al.</i> , 1968; Kohn <i>et al.</i> , 1972; Carvalho <i>et al.</i> , 1974; Barbosa, 1991; Brasil e Amato, 1992; Brum, 2005

^N: hospedeiros naturalmente infectados; *: hospedeiros experimentais. ¹ *Echinostoma* sp. reportados como *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802). Todavia, esta espécie não ocorre no Brasil.

2. JUSTIFICATIVA

Os representantes do gênero *Echinostoma* são trematódeos digeneicos parasitos de vertebrados, que possuem taxonomia complexa. Nas últimas duas décadas, o uso de marcadores moleculares tem sido uma abordagem frequente no estudo destes parasitos, possibilitando esclarecer relações intra e interespecíficas, identificar espécies crípticas, como também estágios larvais. No Brasil, apesar de mais de 25 espécies já terem sido reportadas em aves e mamíferos, a maioria dos estudos se baseou exclusivamente na identificação morfológica de parasitos adultos (muitas das quais incompletas e/ou imprecisas), sendo praticamente inexistentes estudos envolvendo análises moleculares. Essa lacuna no conhecimento, fomenta novos estudos baseados em uma abordagem taxonômica integrando dados morfológicos e moleculares. Tais estudos contribuem substancialmente para o avanço no conhecimento da diversidade de espécies deste importante grupo de trematódeos que ocorrem no país.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Realizar estudo taxonômico integrativo a partir da análise de aspectos morfológicos, moleculares e biológicos de amostras de *Echinostoma* spp. obtidas no estado de Minas Gerais, Brasil.

3.2. Objetivos específicos

- Registrar novas ocorrências de espécies de *Echinostoma* spp. em hospedeiros naturalmente infectados no Brasil a partir do estudo de espécimes oriundos do estado de Minas Gerais;
- Realizar estudos biológicos experimentais a partir de larvas encontradas em moluscos dulcícolas naturalmente infectados visando a obtenção de parasitos adultos;
- Gerar dados moleculares (marcadores 28S, ITS, *cox1* e *nad1*) dos espécimes de *Echinostoma* spp. oriundos do estado de Minas Gerais visando esclarecer a taxonomia e posição filogenética das espécies encontradas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras estudadas

Para o presente estudo foram consideradas amostras de *Echinostoma* spp. oriundas de diferentes hospedeiros coletados em localidades do estado de Minas Gerais. Para fins de apresentação, as amostras serão subdivididas em amostras obtidas durante o período de desenvolvimento do projeto entre 2018 e 2020 e amostras previamente coletadas como parte de outros projetos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa entre 1995 e 2012.

4.1.1. Amostras obtidas durante o projeto (2018–2020)

4.1.1.1. Pesquisa de *Echinostoma* spp. em hospedeiros definitivos naturalmente infectados

O trato gastrointestinal de 46 *G. gallus* criados em sistema caipira e abatidos para consumo foram doados para estudos helmintológicos por proprietários no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20°45'14" S; 42°52'55" O), em junho de 2018 (CEUA/UFV 69/2017). Cada segmento do trato gastrointestinal examinado foi aberto individualmente com tesoura em corte longitudinal e lavado com água corrente em peneira com abertura de 100 µm para permitir a remoção dos helmintos aderidos à mucosa. Os helmintos adultos recuperados foram separados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo solução salina (NaCl 0,85%).

4.1.1.2. Pesquisa de *Echinostoma* spp. em hospedeiros intermediários

Visando a pesquisa de estágios larvais de *Echinostoma* spp. em moluscos foram realizadas coletas malacológicas em diversos locais do estado de Minas Gerais, conforme demonstrado na Tabela 4. Os moluscos gastrópodes foram coletados com auxílio de rede de nylon em forma de D e quando visualizados próximos às margens das coleções aquáticas ou aderidos a outros substratos eram recolhidos com auxílio de pinça metálica. O material coletado foi acondicionado em sacos plásticos e transportados ao Laboratório de Biologia de Trematoda, onde foi realizada triagem dos gastrópodes, lavados em água corrente, e colocados individualmente em placas de poliestireno de 6, 12 ou 24 poços

contendo cerca de 2 ml de água desclorada, e então expostos à fotoestimulação artificial por 2 h. As placas foram examinadas em estereomicroscópio imediatamente após a fotoestimulação e pela manhã do dia seguinte para verificar emergência de cercárias.

Tabela 4 Dados de coletas malacológicas realizadas durante o projeto em diversos municípios do estado de Minas Gerais

Data de coleta	Município	Região	Coordenadas
23/06/2019	Esmeraldas	Metropolitana de Belo Horizonte	19°71'01" S; 44°14'32" O
18/07/2019	Patos de Minas	Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba	18°60'67" S; 46°51'99" O
19/07/2019			18°58'39" S; 46°50'47" O
08/08/2019	Esmeraldas	Metropolitana de Belo Horizonte	18°70'93" S; 46°58'45" O
			19°63'73" S; 44°31'05" O
			19°65'34" S; 44°29'88" O
11/08/2019	Esmeraldas	Metropolitana de Belo Horizonte	19°67'52" S; 44°28'72" O
			19°71'02" S; 44°14'30" O
			19°71'34" S; 44°14'42" O
20/08/2019	Viçosa	Zona da Mata	20°76'62" S; 42°86'97" O
			20°76'39" S; 42°86'87" O
			20°76'82" S; 42°85'64" O
			20°75'62" S; 42°82'77" O
06/09/2019	Esmeraldas	Metropolitana de Belo Horizonte	19°71'01" S; 44°14'32" O
22/10/2019	Sete Lagoas	Central Mineira	19°55'60" S; 44°24'06" O
	Ribeirão das Neves	Metropolitana de Belo Horizonte	19°45'38" S; 44°23'26" O
			19°44'22" S; 44°23'98" O
19/12/2019	Patos de Minas	Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba	19°75'88" S; 44°12'35" O
17/11/2020	Esmeraldas	Metropolitana de Belo Horizonte	18°70'87" S; 46°58'44" O
			19°71'00" S; 44°14'37" O
			19°71'22" S; 44°14'26" O
23/11/2020	Esmeraldas	Metropolitana de Belo Horizonte	19°71'37" S; 44°14'55" O
			19°71'98" S; 44°13'32" O
24/11/2020	Sete Lagoas	Central Mineira	19°71'02" S; 44°14'28" O
	Esmeraldas	Metropolitana de Belo Horizonte	19°55'61" S; 44°24'08" O
			19°71'65" S; 44°16'02" O

Além das coletas supracitadas, amostras de moluscos infectados por cercárias com morfologia sugestiva de *Echinostoma* spp. obtidas em outros projetos desenvolvidos no laboratório ou encaminhadas para estudo e identificação como parte da rotina do laboratório também foram incluídas neste projeto (detalhes destas amostras serão apresentadas nos capítulos pertinentes).

4.1.2. Amostras previamente obtidas (1995–2012)

Amostras de *Echinostoma* spp. previamente obtidas através de estudos experimentais realizados como parte de outros projetos de pesquisa conduzidos no laboratório foram incluídas neste estudo. Tais amostras correspondem a parasitos adultos obtidos a partir da infecção experimental de vertebrados (aves e roedores) em estudos iniciados a partir de cercárias ou metacercárias recuperadas de moluscos gastrópodes naturalmente infectados. As amostras correspondem a 4 morfoespécies obtidas em dois municípios do estado de Minas Gerais. As informações gerais referentes a estas amostras são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 Exemplares de *Echinostoma* spp. obtidos previamente e utilizados no presente estudo.

Amostra	Identificação preliminar	Localidade	Data de obtenção	HI	HD (experimentais)	Tempo de infecção	Exemplares disponíveis para morfologia	Material para biologia molecular
1	<i>E. exile</i>	Belo Horizonte (Lagoa da Pampulha)	08/02/2012	<i>S. marmorata</i>	<i>C. livia</i>	14 dpi	3	sim
2	<i>E. exile</i>	Belo Horizonte (Lagoa do Nado)	11/05/2017	<i>S. marmorata</i>	<i>M. unguiculatus</i>	14 dpi	7	sim
3	<i>Echinostoma</i> sp. 1	Belo Horizonte (Museu de História Natural da UFMG)	29/05/2010	<i>S. marmorata</i>	<i>C. livia</i>	14 dpi	10	sim
4	<i>Echinostoma</i> sp. 1	Belo Horizonte (Museu de História Natural da UFMG)	29/05/2010	<i>S. marmorata</i>	<i>S. canaria</i>	14 dpi	4	sim

HI: hospedeiro intermediário naturalmente infectado; HD: hospedeiro vertebrado definitivo experimentalmente infectado

Nesses experimentos previamente realizados, os animais foram inoculados por metacercárias obtidas em moluscos naturalmente ou experimentalmente infectados. Diferentes tipos de potenciais hospedeiros definitivos foram avaliados (pombos, canários e gerbils). Nos estudos envolvendo roedores, os animais foram submetidos a um protocolo de imunossupressão através da inoculação subcutânea de dexametasona (25 mg/ kg) diariamente até o fim do experimento. O sucesso de infecção foi inicialmente verificado por exame parasitológico de fezes pelo método de sedimentação espontânea (Lutz, 1919). Todos os animais utilizados nos experimentos foram mantidos em laboratório, com água e alimentação fornecida *ad libitum* até o fim dos experimentos. Os procedimentos relacionados a infecção e eutanásia dos animais utilizados nestas amostras previamente obtidas foram devidamente aprovados (CEUA/UFMG 199/2009 e 20/2016).

4.2. Estudos morfológico e morfométrico

Cercárias emergidas de moluscos gastrópodes naturalmente infectados foram examinadas a fresco com auxílio de corantes vitais (parasitolho neutro e sulfato azul do Nilo a 0,05%) em microscópio óptico Olympus BH2 (Olympus, Tóquio, Japão). Uma parte das cercárias foi morta em água a 70°C e fixada em formalina a 10% para estudos morfométricos (Pinto e Melo, 2013).

Para verificar a presença de estágios evolutivos não emergentes (esporocisto, rédia e metacercárias), os moluscos naturalmente infectados foram comprimidos entre placas de vidro, dissecados com auxílio de estiletos sob estereomicroscópio, as larvas coletadas com auxílio de micropipeta e verificadas em microscópio de luz. Esses estágios larvais também foram fixados em formalina a 10% para confecção de lâminas não permanentes e observados em microscópio óptico.

Os helmintos adultos foram fixados individualmente sob compressão com formalina a 10% a 70°C e posteriormente corados pelo carmim aceto alúmen, desidratados em série crescente de álcoois, clarificados em creosoto de Faia e montados em lâminas permanentes com bálsamo do Canadá. Para algumas das espécies avaliadas, em que havia material disponível (não montado) para análise, amostras dos parasitos foram seccionadas na região imediatamente anterior ao acetábulo com auxílio de uma lâmina de bisturi. Este fragmento contendo o colar cefálico transferido para uma lâmina e clarificados em lactofenol para melhor visualização do número, tamanho, forma e disposição dos espinhos em microscópio de luz (Fried *et al.*, 2009).

Os parasitos adultos foram fotografados com auxílio de uma câmera digital Samsung® ES70 (Samsung, Brasil) acoplada ao estereomicroscópio. Já os estágios larvais foram fotografados com uma câmera digital Leica ICC50 HD acoplada ao microscópio Leica DM500 e analisados com software Leica Application Suite (LAZ EZ), versão 2.0 (Leica Microsystems, Alemanha).

As análises morfométricas dos estágios evolutivos encontrados foram baseadas em medidas tomadas por meio de uma ocular micrometrada a partir das preparações não permanentes (material fixado em formalina 10%) ou permanentes (adultos obtidos natural ou experimentalmente) e comparadas às descrições morfológicas de autores que previamente reportaram estágios evolutivos de algumas espécies de *Echinostoma* encontradas no Brasil (Lutz, 1924; Lie, 1968; Travassos *et al.*, 1969; Lie e Basch, 1966, 1967, Hsu *et al.*, 1968; Maldonado Jr. *et al.*, 2001a, 2003; Pinto e Melo, 2012; Fernandes *et al.*, 2015).

As abreviaturas utilizadas nas descrições morfológicas estão de acordo com as descrições mais recentes de *Echinostoma* por Kostadinova (2005), Faltýnková *et al.* (2015) e Georgieva *et al.* (2017) como seguem: BL, comprimento do corpo; BW, largura máxima do corpo; BW (%), largura do corpo como proporção do comprimento do corpo = forma do corpo; FORE, comprimento da distância pré-acetabular; FORE (%), distância pré-acetabular como proporção do comprimento corporal; CL, comprimento do colar cefálico; CW, largura do colar cefálico; CW / BW (%), colar cefálico como proporção da largura do corpo; Nº espinhos, número de espinhos presentes no colar cefálico; AOSL, comprimento dos espinhos angulares orais; AASL, comprimento dos espinhos angulares aborais; LSL, comprimento dos espinhos laterais; DSL, comprimento dos espinhos dorsais; OSL, comprimento da ventosa oral; OSW, largura da ventosa oral; VSL, comprimento da ventosa ventral; VSW, largura da ventosa ventral; OSW / VSW, relação entre as larguras das ventosas; ESL, comprimento do esôfago; ESL (%), comprimento do esôfago como proporção do comprimento do corpo; PL, comprimento da pré-faringe; PHL, comprimento da faringe; PHW, largura da faringe; CSL, comprimento da bolsa do cirro; CSW, largura da bolsa do cirro; ATL, comprimento do testículo anterior; ATW, largura do testículo anterior; PTL, comprimento do testículo posterior; PTW, largura do testículo posterior; OVL, comprimento do ovário; OVW, largura do ovário; TEND, comprimento da região pós-testicular; TEND (%), comprimento da região pós-testicular como proporção do comprimento do corpo; OVAR, distância entre o ovário e a margem posterior da ventosa ventral; OVAR (%), distância entre o ovário e a margem posterior da ventosa ventral como proporção do comprimento do corpo; Ovos (C), comprimento dos ovos; Ovos (L), largura dos ovos.

Os materiais-tipo e espécimes representativos dos exemplares adultos (das novas espécies) montados em lâminas permanentes serão depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC) e na Coleção de Trematódeos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-TRE).

4.3. Estudos moleculares

4.3.1. Extração e quantificação de DNA

As amostras de DNA de todos os equinóstomos foram fixadas em etanol 95% e mantidas a -20°C. Elas encontram-se estocadas em freezer localizado no Laboratório de Taxonomia de Trematoda, disponíveis para estudos futuros.

As extrações de DNA foram realizadas usando os *kits* Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Estados Unidos) para amostras de adultos, de acordo com as instruções de cada fabricante. A concentração de DNA extraído de cada amostra foi estimada usando um espectrofotômetro de microvolume NanoDrop® ND-1.000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Para verificar a pureza do DNA extraído, determinou-se a relação da absorbância obtida nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm.

4.3.2. Amplificação

As regiões dos genes rDNA e mtDNA foram amplificadas e a seleção das regiões a serem exploradas para cada espécie foi determinada após levantamento em trabalhos recentes envolvendo equinostomatídeos e seus marcadores mais utilizados, sendo referidas em cada capítulo.

O gene nuclear 28S rDNA foi amplificado parcialmente usando os *primers* dig12 e 1500R (Tkach *et al.*, 2003), seguindo as condições de PCR descritas por Tkach *et al.* (2016). O espaçador transcrito interno (ITS) foi amplificado usando os *primers* BD1 e BD2 (Luton *et al.*, 1992; Morgan e Blair, 1995), seguindo as condições de PCR descritas por Moszczyńska *et al.* (2009). O gene citocromo c oxidase subunidade 1 (*cox1*) foi amplificado usando os *primers* JB3 e COI-R Trema (Bowles *et al.*, 1995; Tkach *et al.*, 2003), seguindo as condições de PCR descritas por Miura *et al.* (2005). Os fragmentos da subunidade 1 do gene nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (*nad1*) foram amplificados usando os *primers* NDJ11 e NDJ2A

(Morgan e Blair, 1998b; Kostadinova *et al.*, 2003), seguindo as condições de PCR descritas por Morgan e Blair (1998b).

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em um termociclador Labcycler® (Sensoquest, Alemanha) com um volume final de 25 µl para cada amostra: 12,5 µl de Platinum® Hot Start Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific), 1,25 pmol de cada *primer*, 2,5 µl de solução de DNA obtida da extração (concentração entre 25–50 ng de DNA) e 8,75 µl de água ultrapura.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e marcados com UniSafe Dye® (20.000X) (Uniscience, Brasil) na quantidade de 1,5 µl para cada 30 ml de tampão Tri-acetato-EDTA (TAE) 0,5M para visualização em câmara com luz ultravioleta. Os produtos que exibiam bandas com tamanho esperado no gel de agarose foram selecionados para o processo de purificação.

4.3.3. Purificação e Sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados adicionando 25 µl de polietilenoglicol (PEG) (PEG 20% em solução de NaCl 2,5M) à cada amostra (Promega, Estados Unidos). O conteúdo de cada amostra foi transferido para microtubos de 1,5 ml e homogeneizados em vórtex por 1 min. Após banho seco (37°C por 15 min.), o material foi centrifugado por 15 min. a 13.000 rpm, descartando o sobrenadante, e adicionados 125 µl de etanol 80% refrigerado. O material foi submetido novamente ao processo de centrifugação (5 min a 13.000 rpm) e descarte de sobrenadante, por duas vezes subsequentes. Por fim, o microtubo foi mantido à temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol. O DNA contido na amostra foi ressuscitado em 20 µl de água ultrapura e novamente realizada a leitura da concentração (ng de DNA/ µl de solução) de fragmentos obtidos em NanoDrop® ND-1.000.

Uma nova eletroforese em gel de agarose a 1% foi realizada previamente ao envio das amostras para sequenciamento à empresa Myleus Biotecnologia (Belo Horizonte, Brasil). O sequenciamento em ambas as direções foi realizado por eletroforese capilar em um sequenciador ABI3730 usando o *kit* Big Dye® Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems, Estados Unidos) pelo método de Sanger.

4.3.4. Alinhamento

Cromatogramas de sequência obtidos foram alinhados por correspondência nucleotídica e editados usando o *software* ChromasPro versão 2.0.1 (Technelysium Pty Ltd, Austrália) e os consensos foram comparados a outras sequências disponíveis no banco de dados de sequências de nucleotídeos GenBank® (National Center for Biotechnology Information, Estados Unidos) utilizando as buscas da Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) (Altschul *et al.*, 1990) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequências duplicadas não foram adicionadas às análises. Para cada gene nuclear, as sequências foram alinhadas usando a ferramenta MUSCLE e as sequências de genes mitocondriais usando a ferramenta CLUSTAL W, ambas implementadas no *software* Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versão X para conjuntos de dados nuclear e mitocondrial (Kumar *et al.*, 2018). Os alinhamentos foram cortados para corresponder à sequência mais curta antes das análises filogenéticas.

Todas as sequências contíguas montadas e editadas foram submetidas e disponibilizadas no GenBank® (números de acesso mostrados na seção Resultados). Além disso, o acesso ao patrimônio genético tem sido registrado à medida em que os trabalhos científicos são publicados.

4.3.5. Análises filogenéticas

Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB) foram os critérios utilizados para gerar as hipóteses filogenéticas. A escolha dos modelos evolutivos utilizados para as análises foi determinada pelo critério de informação Bayesiana (BIC) no MEGA X para cada marcador selecionado.

Os conjuntos de dados nuclear e mitocondrial foram usados de acordo com os objetivos principais das análises moleculares: os dados de 28S e ITS foram usados para confirmar que nossos isolados pertenciam a *Echinostoma* em Echinostomatidae, e os dados de *cox1* e *nad1* foram usados para avaliar as posições filogenéticas dentro do gênero. Grupos externos para cada conjunto de dados foram escolhidos com base em estudos filogenéticos moleculares anteriores, incluindo representantes de *Echinostoma* e táxons relacionados (Serenio-Uribe *et al.*, 2015; Tkach *et al.*, 2016; Georgieva *et al.*, 2017; Nakao e Sasaki, 2021).

Nas árvores geradas por MV os suportes dos clados foram estimados pelo método de *bootstrap* (10^3 replicatas). As análises de IB foram geradas usando MrBayes versão 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) em duas execuções simultâneas pelo método de Monte Carlo via cadeias

de Markov (MCMC), com quatro cadeias por 10^6 gerações, e amostragem de topologias a cada 100 gerações. O “burn-in” foi estabelecido para os primeiros 25% das árvores amostradas, e o suporte nodal foi estimado como probabilidade posterior. As árvores obtidas por IB foram visualizadas pelo *software* FigTree versão 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Aquelas obtidas por MV, foram salvas em formato png, visualizadas e editadas posteriormente com auxílio de *software* de edição de imagens.

4.3.6. Análises de delineamento de espécies

Para testar hipóteses taxonômicas de algumas espécies de *Echinostoma*, dois métodos de descoberta de espécies (não exigindo identificação prévia das espécies) foram empregados: o Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP) baseado em distância nucleotídica (Puillandre *et al.*, 2021) e a árvore de Poisson baseada no modelo de processo (PTP) (Zhang *et al.*, 2013), foram realizados usando o conjunto de dados *nad1*, uma vez que este gene é considerado adequado para discriminação de espécies de *Echinostoma* (Georgieva *et al.*, 2014). As análises ASAP foram executadas online (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/>) usando o alinhamento final *nad1* como entrada e parâmetros padrão para os três modelos de substituição usados na computação das distâncias, Jukes-Cantor (JC69), Kimura (K80) e distância simples (distância-p) e apenas a partição com menor pontuação ASAP para cada métrica foi considerada. A análise de PTP foi realizada adicionando suporte Bayesiano, usando a árvore de IB como entrada e parâmetros padrões, exceto o MCMC que foi executado para 500.000 gerações no servidor *web* bPTP (<https://species.h-its.org/ptp/>) e a convergência das cadeias foi verificada no gráfico de rastreamento de verossimilhança.

4.3.7. Edição de árvores

As árvores geradas foram editadas com a ajuda do *software* Adobe Photoshop® v.22.4.3 (Adobe Inc., Estados Unidos) e quando demonstravam topologias equivalentes, foram agrupadas em uma só e os valores de suportes nodais obtidos por cada análise foram exibidos em conjunto.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo serão apresentados a seguir na forma de capítulos.

Capítulo 1: A new species of *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) from the ‘*revolutum*’ group found in Brazil: refuting the occurrence of *Echinostoma miyagawai* (= *E. robustum*) in the Americas

Artigo publicado na revista *Parasitology* 149: 325–336, 2022. doi: 10.1017/S0031182021001864

Este trabalho teve como objetivo principal descrever uma nova espécie de *Echinostoma* encontrada em uma ave caipira naturalmente infectada no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, utilizando uma abordagem integrativa. Os exemplares coletados foram submetidos a estudos morfológico e molecular e contribuíram com informações que podem ser aplicadas ao esclarecimento da taxonomia e sistemática do grupo ‘*revolutum*’.

Research Article

Cite this article: Valadão MC, López- Hernández D, Alves PV, Pinto HA (2022). A new species of *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) from the 'revolutum' group found in Brazil: refuting the occurrence of *Echinostoma miyagawai* (= *E. robustum*) in the Americas. *Parasitology* 149, 325–336. <https://doi.org/10.1017/S0031182021001864>

Received: 3 September 2021
Revised: 17 October 2021
Accepted: 17 October 2021
First published online: 28 October 2021


Key words:
Echinostomes; *Gallus domesticus*; integrative taxonomy; trematodes

Author for correspondence:
Hudson A. Pinto,
E-mail: hudsonalves13@icb.ufmg.br

© The Author(s), 2021. Published by Cambridge University Press

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

A new species of *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) from the 'revolutum' group found in Brazil: refuting the occurrence of *Echinostoma miyagawai* (= *E. robustum*) in the Americas

Marisa C. Valadão, Danimar López-Hernández, Philippe V. Alves and Hudson A. Pinto 

Department of Parasitology, Laboratório de Biologia de Trematoda, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, P.O. Box 486, 30123-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Abstract

Although *Echinostoma robustum* (currently a synonym of *E. miyagawai*) was reported in the Americas based on molecular data, morphological support on adult parasites is still required. Herein, a new species of *Echinostoma* is described based on worms found in a chicken from Brazil. Molecular phylogenetic analyses based on 28S (1063 bp), ITS (947 bp) and Nad1 (442 bp) datasets reveal the inclusion of the new species within *Echinostoma* 'revolutum' species complex. Moreover, it was verified the conspecificity between cercariae previously identified as *E. robustum* in Brazil [identical ITS and only 0.3% of divergence (1 nucleotide) in Nad-1]. Species discovery analyses show that these two isolates form an independent lineage (species) among *Echinostoma* spp. Compared to *E. miyagawai*, the new species presents relatively high divergence in Nad1 (7.88–9.09%). Morphologically, the specimens are distinguished from all nominal species from the 'revolutum' species complex by the more posterior position of the testes (length of post-testicular field as a proportion of body length about 20%). They further differ from *E. miyagawai* and South American *Echinostoma* spp. by the higher proportion of forebody to the body length. Therefore, combined molecular and morphological evidence supports the proposal of the species named here as *Echinostoma pseudorobustum* sp. nov.

Introduction

The trematodes of the genus *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Echinostomatidae Looss, 1899) are intestinal parasites of birds and mammals with a worldwide distribution. Species bearing 37 spines in the head collar and sharing morphological and biological similarities are considered as belonging to the 'revolutum' species complex, referring to the type species of the genus, *Echinostoma revolutum* (Frölich, 1802) (Kanev, 1994; Kostadinova *et al.*, 2003; Fried and Graczyk, 2004; Georgieva *et al.*, 2013, 2017; Faltýnková *et al.*, 2015). This speciose group of echinostomes has a controversial taxonomy mostly due to morphological similarities between species, the existence of cryptic diversity and the superficial or inaccurate description of some species (Kostadinova and Gibson, 2000; Esteban and Muñoz-Antoli, 2009; Georgieva *et al.*, 2014; Toledo *et al.*, 2014; Chai *et al.*, 2020).

In order to better understand the interrelationships and actual diversity within the 'revolutum' group, more robust analyses based on integrative taxonomy approaches are needed for most species. This approach has shown compelling evidence to support the taxonomic reappraisal of several species that had their affiliation clarified, mainly from Europe and Asia (Georgieva *et al.*, 2013, 2014, 2017; Faltýnková *et al.*, 2015; Chai *et al.*, 2021). Among the species that had its taxonomy recently illuminated with new morphological and molecular data is *Echinostoma miyagawai* Ishii, 1932. This species, originally described from Asia, had its occurrence in Oceania and Europe confirmed, as well as its conspecificity with *Echinostoma friedi* Toledo *et al.*, 2000, and *E. revolutum* sensu Morgan and Blair (1995, 1998a, b) – both synonyms of *E. miyagawai* (Kostadinova *et al.*, 2003; Georgieva *et al.*, 2014, 2017; Faltýnková *et al.*, 2015). Recently, some isolates from Bangladesh identified as *Echinostoma robustum* Yamaguti, 1935 were shown to be molecularly indistinguishable from *E. miyagawai* (Mohanta *et al.*, 2019; Heneberg, 2020; Chai *et al.*, 2021). Based on these findings, the synonymy between *E. robustum* and *E. miyagawai* was recently proposed (Chai *et al.*, 2021).

More complexity for this scenario comes with the report of *E. robustum* in the New World based on larval and adult parasites from the USA and Brazil (Detwiler *et al.*, 2010). The Brazilian isolate was identified after the molecular study of cercariae found in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), for which adult forms are unknown. Although different authors have accepted the occurrence of *E. robustum* in the Americas mostly relying on the findings of Detwiler *et al.* (2010), there is molecular evidence that these parasites belong to as-of-yet undescribed species of the 'revolutum' species complex or known species for which molecular data

are not available (Georgieva *et al.*, 2014; Heneberg, 2020; Chai *et al.*, 2021). In the present study, 37-collar-spined echinostomes found in a free-range chicken from Brazil were subject to morphological and molecular studies. Results obtained revealed that the isolate previously identified in the country as *E. robustum* is a new species herein described.

Materials and methods

Morphological study

The gastrointestinal tracts of 46 free-range chickens slaughtered for consumption were donated by owners from the municipality of Viçosa (20°45'14"S, 42°52'55"W), Minas Gerais, Brazil, in June 2018. Each segment of the gastrointestinal tract was individually opened with scissors in a longitudinal section and washed with tap water over a 100 µm mesh sieve. The helminths recovered were separated in Petri dishes containing physiological saline (0.9% NaCl). Specimens of trematodes were compressed between glass slides and fixed in 10% formalin. Subsequently, they were stained with alum acetocarmine, dehydrated in ethanol series, diaphanized in beechwood creosote and mounted on permanent slides with Canada balsam.

Morphological and morphometric studies of permanent preparations were performed under an Olympus BH2 optical microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Measurements were obtained with the aid of a micrometre eyepiece and are expressed in micrometres, unless otherwise indicated. The abbreviations used in the morphological description are as follows: BL, body length; BW, maximum body width; BW/BL (%), body width as a proportion of the body length = shape of the body; FORE, forebody length; FORE (%), forebody as a proportion of body length; CL, head collar length; CW, head collar width; CW/BW (%), head collar as a proportion of body width; ASL, angular spines length; ASW, angular spines width; LSL, lateral spines length; LSW, lateral spines width; DSL, dorsal spines length; DSW, dorsal spines width; OSL, oral sucker length; OSW, oral sucker width; VSL, ventral sucker length; VSW, ventral sucker width; OSW/VSW, oral sucker to ventral sucker width ratio; ESL, esophagus length; ESL/BL (%), esophagus length as a proportion of body length; PL, prepharynx length; PHL, pharynx length; PHW, pharynx width; ATL, anterior testis length; ATW, anterior testis width; PTL, posterior testis length; PTW, posterior testis width; TEND, length of post-testicular region; TEND (%), length of post-testicular field as a proportion of body length; OVL, ovary length; OVW, ovary width; OVAR, distance between ovary and posterior margin of ventral sucker; OVAR(%), distance between ovary and posterior margin of ventral sucker as a proportion of the body length.

Photographs were taken with a Leica ICC50 HD digital camera coupled to the microscope Leica DM500 and analysed in the Leica Application software suite (LAZ EZ), version 2.0 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Drawings were made using a camera lucida. The type material is deposited in the Helminthological Collection of the Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC) and Collection of Trematodes of the Federal University of Minas Gerais (UFMG-TRE).

Molecular study

An ethanol-fixed specimen was used in the molecular study. DNA was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. The concentration of the extracted DNA was estimated using a microvolume spectrophotometer NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

Partial regions of the genes 28S, ITS and Nad1 were amplified using the primer pairs Dig-12/1500R, BD1/BD2 and NDJ11/NDJ2a, respectively (Luton *et al.*, 1992; Morgan and Blair, 1995; Kostadinova *et al.*, 2003; Tkach *et al.*, 2003). PCR reactions were performed in a final volume of 25 µL, which included 12.5 µL of GoTaq® G2 Hot Start Polymerase DNA Polymerase (Promega), 1.25 pmol of each primer, about 50 ng of template DNA and sterile ddH₂O. PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel, and the band of the expected size was purified with polyethylene glycol (PEG) [20% PEG 8000 (Promega) in 2.5 M NaCl solution]. Purified DNA was sequenced in both directions by capillary electrophoresis in an ABI3730 sequencer using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Sequence chromatograms obtained were aligned and edited using the ChromasPro v.2.0.1 (Technelysium Pty Ltd, Australia) and contigs were used for phylogenetic analyses. They were compared with the sequences of species of *Echinostoma* available in GenBank obtained with Basic Local Alignment Search Tool – BLAST® (Altschul *et al.*, 1990) searches (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). The sequences were assembled into three alignments with selected echinostomes using the MUSCLE implemented in MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Both nuclear and mitochondrial datasets were used according to the main goals of the molecular analyses, as follows: 28S data were used to confirm that our isolate is nested within *Echinostoma* in the Echinostomatidae, and the ITS and Nad1 were used to assess its phylogenetic position within the genus. The alignments were trimmed to match the shortest sequence prior to the phylogenetic analyses. The evolutionary models used for the analyses were determined by Bayesian information criterion in MEGA X, corresponding to GTR + G + I for 28S, K2 + G for ITS and HKY + G + I for Nad1. Outgroups for each dataset were chosen based on previous molecular phylogenetic studies including *Echinostoma* representatives and related taxa (Tkach *et al.*, 2016). Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) were the methods used to generate phylogenetic hypotheses. ML analyses were performed in MEGA X and the nodal support was measured using the bootstrap test with 1000 replicates. BI analyses were performed with MrBayes v.3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) using Markov chain Monte Carlo (MCMC) for 1000000 generations and sampling every 1000 generations. The 'burn-in' was established for the first 25% of the trees sampled, and nodal support was estimated with posterior probability.

For testing the taxonomic hypothesis of *Echinostoma pseudorobustum* sp. nov. as revealed by morphological evidence (see below), besides phylogenetic position and genetic distances, we used three species discovery methods (not requiring prior species assignments), namely the distance-based Assemble Species by Automatic Partitioning (ASAP) (Puillandre *et al.*, 2021), the tree-based Poisson Tree Process (PTP) and multi-rate PTP (mPTP) models (Zhang *et al.*, 2013; Kapli *et al.*, 2017). These analyses were performed using the Nad1 dataset as this gene is considered suitable for barcoding species of *Echinostoma* (Georgieva *et al.*, 2014). The latter (mPTP) was used especially because it has been shown to be more accurate for species delimitation in datasets with uneven sampling as in our Nad1 data (Blair and Bryson, 2017). ASAP analyses were run online (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/>) using the final Nad1 alignment as input and default parameters for the three-distance metrics available, i.e. Jukes-Cantor (JC69), Kimura (K80) and simple distance (*p*-distance); only the partition showing the lowest ASAP-score for each metric was considered. PTP analyses were performed in the bPTP and mPTP web servers (<https://species.h-its.org/ptp/>; <https://mptp.h-its.org/#/tree>), using the BI tree as input and default parameters, except the MCMC for the bPTP analysis.

that was run for 500 000 generations; the convergence of chains was checked in the likelihood trace plot. Sequences obtained were deposited in GenBank.

Results

From the total of 46 chickens evaluated during the helminthological study, only one bird (2.2%) was found harbouring three morphologically similar specimens of echinostomes; one individual was used in the molecular analyses and the other two (paragenophores voucher specimens *sensu* Pleijel *et al.*, 2008) were used in the morphological description. The morphology and molecular data gathered revealed a hitherto unknown species of 37-collar-spined *Echinostoma* from the 'revolutum' group, which is described here as follows.

Family Echinostomatidae Looss, 1899

Genus *Echinostoma* Rudolphi, 1809

Echinostoma pseudorobustum sp. nov.

[syn. *Echinostoma robustum* ex *Biomphalaria glabrata* of Detwiler *et al.*, 2010]

Type host: *Gallus gallus domesticus*

Type-locality: Viçosa, State of Minas Gerais, Brazil

Type-material: Holotype – CHIOC 39709

Paratype – UFMG-TRE 121

Site in host: caeca

Prevalence: 2.2% (1/46); infected chicken was found harbouring three adult echinostomes.

Representative DNA sequences: 28S OK586835, ITS OK586836, Nad1: OK564515

ZooBank registration: urn:lsid:zoobank.org:act:273DDBE0-EFF8-4EEA- ACD9-E5915495C382

Etymology: The new species is named based on the previous assignment of its larval stages to *Echinostoma robustum* by Detwiler *et al.* (2010). The species name derives from the prefix *pseudo-* (false) added to the epithet *robustum*.

Description

[Based on two specimens (Figs 1 and 2); measurements are presented in Table 1]. Elongated body, flattened dorsoventrally, narrow, with maximum width at the level of ventral sucker (Figs 1 and 2). Body length/body width ratio 6–7:1. Forebody 19.3% (holotype) and 18.5% (paratype) of body length. Tegument with small spines from head collar to median region of body. Head collar well-developed, reniform, 45.8% and 53.2% of body width, with 37 spines, arranged as follows: 5 angular spines on each edge of head collar, 6 lateral spines on each side, and 15 dorsal spines in a double row. Oral sucker muscular, prepharynx present, small, pharynx ovoid, muscular, oesophagus occupying 9.8 and 10% of total body length, bifurcating in intestinal caecum to ventral sucker. Blind caeca lateral, almost reaching the posterior end, overlapping vitellaria. Ventral sucker muscular, oval, in the equatorial region of the body. Average ratio between the diameter of oral sucker and ventral sucker 1:2.5. Two testes, rounded or subglobular, tandem, similar in size, in the final quarter of body, at 2 and 2.28 mm from the posterior end, corresponding to 18.4 and 19.8% of total body length. Cirrus-sac oval, between the level of intestinal bifurcation and the anterior margin of ventral sucker, containing seminal vesicle, pars prostatica, ejaculatory duct and cirrus. Genital pore under intestinal bifurcation. Ovary oval, in the third quarter of the body. Mehlis' gland contiguous with ovary and anterior testis. Vitellaria in two lateral fields, from pre-equatorial region to posterior end of the body, overlapping caeca; fields enlarged towards post-testicular region but non-confluent. Uterus intercecal, with many coils, between the posterior margin of ventral sucker and ovary, occupying

38.8% and 44.4% of total body length. Egg oval, yellow, operculated, immature.

Remarks

The new species can be readily distinguished from the remaining *Echinostoma* of the 'revolutum' group by having the posterior testis located at the shortest distance to the posterior end, representing <20% of the body length (TEND 18.4 and 19.8%). *Echinostoma pseudorobustum* sp. nov. further differs from its congeners described in South America, namely *Echinostoma barbosa* Lie and Basch, 1966; *Echinostoma chloephae* Sutton and Lunaschi, 1980; *Echinostoma erraticum* Lutz, 1924; *Echinostoma luisreyi* Maldonado *et al.*, 2003; *Echinostoma mendax* Dietz, 1910; *Echinostoma microrchis* Lutz, 1924; *Echinostoma neglectum* Lutz, 1924; *Echinostoma nephrocystis* Lutz, 1924, and *Echinostoma rodriguezi* Hsu *et al.*, 1968, by its larger body size (BL 10.8 and 11.5 mm vs <10.8 mm) and longer forebody (FORE representing at least 18.5% of the body length, instead of <18% in the above-mentioned species) (see Table 2). The other species with a similar body size is *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967, which can also be easily differentiated by its smaller forebody (FORE 18.5 and 19.3% vs 11.3%), oesophagus length as a proportion of body length (ESL/BW 9.8 and 10% vs 4.3%), head collar as a proportion of body width (CW/BW 45.8 and 53.2% vs 36%) and uterine field (OVAR 38.8 and 44.4% vs 31.3%) but more importantly by the size of dorsal collar spines. Regarding *Echinostoma lindoense* Sandground and Bonne, 1940, a species described in Asia and reported in Brazil by Lie (1968), the new species is differentiated in having a smaller body size (BL 10.8 and 11.5 mm vs 12.4–17.2 mm). This species is very similar to *E. miyagawai*, but considered distinct from it due to the limits for the body length and width, head collar and ventral sucker width and size of cirrus-sac, ovary and testes (Kostadinova *et al.*, 2000).

Even though molecularly characterized cercariae of the new species was identified as *E. robustum* by Detwiler *et al.* (2010) (see below), currently accepted as *E. miyagawai*, adult morphology clearly shows the distinctiveness of *E. pseudorobustum* sp. nov. Comparing with the original description of *E. miyagawai* by Ishii (1932), our specimens are much smaller (BL 10.8 and 11.5 mm vs 21–26 mm), more robust (BW/BL 14.3 and 16.1% vs 11.7%), have rounded testes instead of lobulated ones, longer oesophagus (ESL/BL 9.8 and 10% vs 5.4%) and uterine field (OVAR 38.8 and 44.4% vs 30.5%). In relation to the most recent reports of *E. miyagawai* from Eurasia, *E. pseudorobustum* sp. nov. also shows differences in the morphology of testes (smooth vs irregularly lobed), (Kostadinova *et al.*, 2000; Toledo *et al.*, 2000; Faltýnková *et al.*, 2015; Mohanta *et al.*, 2019; Chai *et al.*, 2021), while comparing to the original description of *E. robustum* of Yamaguti (1935) (Fig. 1B), our specimens were larger and narrower (BW/BL 14.3 and 16.1% vs 23.2%), possess larger forebody (FORE 18.5 and 19.3% vs 16%), head collar width (CW/BW 45.8 and 53.2% vs 43.3%), and uterine field (OVAR 38.8 and 44.4% vs 28%), and smooth testes, unlike the irregularly lobulated ones.

The description of *E. pseudorobustum* sp. nov. led us to propose a slight modification in the diagnosis of *Echinostoma*. It remains as provided by Kostadinova (2005) with the following modification: Testes tandem, elongated-oval, smooth, indented or lobed, contiguous or separated, just post-equatorial; occasionally, anterior testis equatorial (TEND = 18–35%).

Molecular study

Molecular sequences of 28S (1063 bp), ITS (960 bp) and Nad1 (442 bp) genes were successfully obtained for a specimen

Table 1. Morphometric comparisons between *Echinostoma pseudorobustum* sp. nov. and other morphologically similar species of *Echinostoma*

Species	<i>Echinostoma pseudorobustum</i> sp. nov.		<i>Echinostoma miyagawai</i>					<i>Echinostoma lindoense</i>		<i>Echinostoma paraensei</i>	
	Present study		Ishii (1932)	Yamaguti (1935)	Kostadinova et al. (2000)	Faltýnková et al. (2015)	Chai et al. (2021)	Sandground and Bonne (1940)	Lie (1968)	Lie and Basch (1967)	Maldonado Jr et al. (2001)
BL (mm)	10.85 ^H	11.49 ^P	21.0–26.0	7.8–9.8	9.2–11	8.88–13.16	6.19–8.54	13–15	12.42–17.2	7.49–16.03	15.49–16.32
BW (mm)	1.75	1.64	2.0–3.5	1.33–2.18	1.2–1.5	1.15–2.02	1.01–1.42	2.5–3.0	1.4–2.23	0.79–1.95	2.4–2.41
BW(%)	16.1	14.3	11.7*	22.4*	12.9*	11.3–15.4	14.2–20.9	16.8*	–	12.2*	13.8*
FORE (mm)	2.09	2.13	–	1.31*	1.25–1.53	1.53–2.01	0.91–1.27	2.06*	–	1.62*	2.0*
FORE (%)	19.3	18.5	10.7*	16.8*	13–15	13.6–17.2	14–17.2	13.3*	–	11.3*	9.6*
CL	255	309	–	437.5*	393–505	380–597	395–599	543*	–	375*	429*
CW	801	855	890–1100	670–850	598–682	577–842	528–725	780	720–948	396–746	545–657
CW/BW (%)	45.8	53.2	41.2*	39.3*	46–57	37.7–52.2	43.1–58.4	41.7*	–	36*	25*
ASL	39–77	44–76	84–108#	69–87	52–96	93–134	71–83	84–95#	65–92	36–99	37–57
ASW	23–41	24–31	26–28#	20–30	17–29	28–36	19–25	22–28#	–	–	–
LSL	36–107	53–82	–	87–105	67–87	66–124	75–91	–	–	–	52–74
LSW	27–36	23–32	–	21–30	20–29	15–34	18–24	–	–	–	–
DSL	30–80	51–84	–	87–123	58–75	78–109	69–79	–	–	22–33	44–79
DSW	14–32	19–26	–	20–36	19–26	16–34	18–24	–	–	–	–
OSL	200	255	200–240	312.5*	262–337	230–421	227–307	435*	295–392	375*	255–338
OSW	309	346	–	310–400	262–355	241–421	233–412	230–510	280–363	216–408	274–384
VSL	746	765	–	810–1.08	655–748	686–1090	594–830	1.196*	–	625*	824–870
VSW	837	801	714–1090	800–960	655–785	621–971	544–910	600–1380	720–1027	456–1.008	917–930
OSW/VSW	1: 2.7	1: 2.3	1: 2*	1: 3*	1: 2.2–2.8	1: 2.4	1: 2.6*	1: 2.7*	–	1: 2*	1: 4.1
ESL	1090	1130	1260–1290	770	542–655	708–854	569–790	543*	780–1185	236–664	388–405
ESL/BL (%)	10	9.8	7*	8.8*	13	–	10.2*	3.5*	–	4.3*	2.1*
PL	123	87	–	–	0–37	40–88	4–41	–	30–68	72–120	129–139
PHL	182	182	–	250–330	262–337	219–304	230–292	326*	250–316	180–348	198–287
PHW	182	182	221–346	220–280	187–355	183–263	197–335	180–400	200–268	180–288	161–231
ATL	710	528	1020–1310	500–620	430–692	511–818	403–653	1.304*	730–1058	348–732	752–844
ATW	583	492	850–1100	410–660	337–505	453–889	588–982	1.304*	490–730	312–612	717–763
PTL	765	564	986–1190	437.5*	449–655	438–1030	477–674	1.522*	750–1058	408–852	917–940
PTW	710	473	884–1020	562.5*	337–524	467–819	593–787	1.304*	474–680	312–516	741–750

TEND (mm)	2	2.28	–	2*	2.82–3.33	2.65–3.75	2.24–2.79	1.92*	–	5.12*	6.0*
TEND (%)	18.4	19.8	29.5*	25.6*	30–32	25.9–32.2	31.2–36.7	29.4*	–	35.6*	29*
OVL	364	273	544–595	210–310	243–355	219–392	198–342	435*	–	375*	476–490
OVW	492	328	612–731	400–500	337–449	336–538	290–620	300–500	316–505	250–408	682–712
OVAR (mm)	4.82	4.46	–	2.12*	2.78*	4.41–5.93	3.54–4.31	3.91*	–	4.5*	7.7*
OVAR (%)	44.4	38.8	32*	27.2*	27.4*	47.7–49.7	50.3–57.7	25.2*	–	31.3*	37.2*
Eggs	92–106	92–135	104–112	111–129	94–96	99–113	79–105	92–124	104–116	104–122	104–112
57–71		42–64	64–72	60–69	60	51–70	56–70	65–76	64–74	74–86	74–85

Measurements are in μm , unless stated otherwise. Abbreviation of the morphological structures are as presented in the text. Asterisk indicates data taken from original drawings. Hash indicates the range for all collar spines. Measurements not provided or missing drawings are indicated by a dash. Superscripted H and P indicate data for Holotype and Paratype, respectively. Data by Yamaguti (1935) correspond to the original description of *Echinostoma robustum*, currently a synonymy of *Echinostoma miyagawai*.

E. pseudorobustum sp. nov. obtained in the same host. After alignment and trimming, datasets composed of 1063 bp of 28S (56 sequences from 55 species/species-level lineages); 947 bp of ITS (12 sequences from 11 species/species-level lineages) and 442 bp of Nad1 (156 sequences from 21 species/species-level lineages) were used in the subsequent analyses. Regarding 28S, >99% of similarity was verified between the Brazilian isolate and all 13 species of *Echinostoma* included in the analysis. Despite being of limited use for tackling the intrageneric relationships, the phylogenetic trees based on this gene clearly show that our isolate is nested within the representatives of *Echinostoma* (Fig. 3). However, the nodal supports for the different clades verified in the 28S tree were most of the time low. On the other hand, phylogenetic trees resulting from ML and BI analyses of both ITS and Nad1 genes showed the newly sequenced *Echinostoma* clustering in a clade together with a Brazilian isolate identified as *E. robustum* lineage D by Detwiler *et al.* (2010) and also confirmed that the new species belongs to the ‘*revolutum*’ group of *Echinostoma* (Figs 4 and 5).

Considering the ITS sequences, *E. pseudorobustum* sp. nov. differed 0.11–2.27% from other 9 species belonging to the genus *Echinostoma* included in the analyses. The newly-generated sequence falls into a clade containing two isolates [one from Brazil (GQ463133 – 0.11% of divergence – 1 nucleotide) and another from the USA (GQ463132 – 0.21% of divergence – 2 nucleotides)] identified as *E. robustum* by Detwiler *et al.* (2010) (Fig. 4).

The analyses of the Nad1 dataset showed high sequence similarity of *E. pseudorobustum* sp. nov. with *E. robustum* lineage D (GQ463055) (0.23% of divergence – 1 nucleotide), confirming their conspecificity. These Brazilian sequences clustered in a well-supported clade, sister to *E. robustum* lineage C (GQ463054) from the USA (Fig. 5). The latter most likely represent either an undescribed species or a known taxon yet not characterized molecularly as well as *E. robustum* lineage A (GQ463053), also from the USA, which appeared in a distantly related clade, sister to a clade composed by 35 sequences previously assigned to different taxa: *E. friedi* (Marcilla *et al.*, unpublished), *E. revolutum* by Morgan and Blair (1998a, b), *E. miyagawai* by Georgieva *et al.* (2014, 2017), Nagataki *et al.* (2015), Li *et al.* (2019), Fu *et al.* (2019), and *E. robustum* by Mohanta *et al.* (2019). Currently, these isolates are treated under a single species with Eurasian + Oceanian distribution, *E. miyagawai*, given the rough similarity in the Nad1 sequences (0.23–2.94%), which falls in the intraspecific range of variability (Georgieva *et al.*, 2014; Nagataki *et al.*, 2015; Chai *et al.*, 2021).

The distance- and tree-based methods of species discovery based on Nad1 yielded similar results (Supplementary Fig. 1), recognizing the conspecificity between the Brazilian isolate (GQ463055) of Detwiler *et al.* (2010) with our newly sequenced specimen and their independent status as *E. pseudorobustum* sp. nov., yet the mPTP analysis also recognized in this new taxon the isolate GQ463054 of the same authors (see below). All distance metrics of the ASAP method recognized 19 species of *Echinostoma*, whereas the bPTP and mPTP methods informed us 20 and 18 taxa, respectively; this difference is due to the disputed affiliation of isolates assigned to *Echinostoma caproni* Richard, 1964 and those potentially belonging to the new species. While the ASAP and mPTP recognized a single entity for all isolates of *E. caproni*, the bPTP admitted two discrete entities. In turn, the bPTP and ASAP support the conspecificity of our isolate only with GQ463055, which further includes the North American isolate GQ463054 from *Ladislavella elodes* (Say, 1821) (= *Lymnaea elodes*) considering the mPTP method. Agreeing with the phylogenetic analyses, all methods indicate that the American isolates assigned to *E. robustum* by Detwiler *et al.*

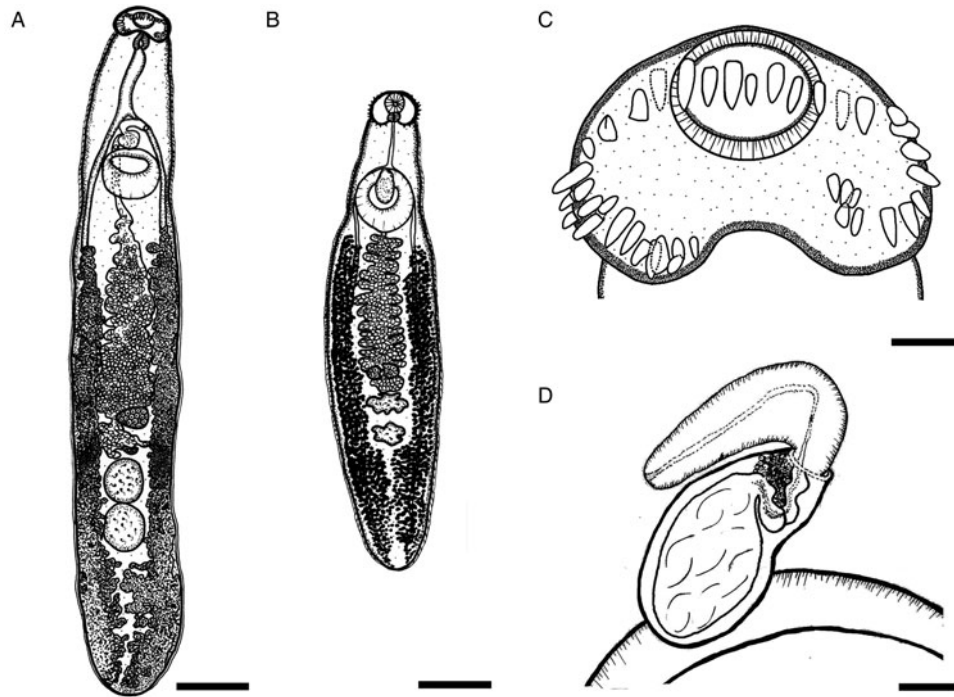


Fig. 1. *Echinostoma pseudorobustum* sp. nov. found in chicken from Brazil: (A) Line drawing of the holotype. (B) *Echinostoma robustum* (currently a synonym of *Echinostoma miyagawai*), a taxon that was previously associated with larval stages of the new species here described (redrawn from Yamaguti, 1935). (C) Line drawing of the collar of spines. (D) Detail of the cirrus-sac. Scale bars: A and B: 1 mm; C and D: 100 μ m.



Fig. 2. *Echinostoma pseudorobustum* sp. nov. found in a chicken from Brazil: (A) Micrograph of the paratype. (B) Micrograph of collar spines showing angular (*) and lateral (#) spines. (C) Micrograph of dorsal spines (+). Scale bars: A: 1 mm; B and C: 100 μ m.

(2010) belong to at least two species other than *E. miyagawai*, including *E. pseudorobustum* sp. nov. and at least one undescribed or non-sequenced species. All methods confirmed that only isolates of Eurasian distribution can be assigned to *E. revolutum* (*sensu stricto*), setting them apart from the North American *E. revolutum* (*sensu lato*) (Georgieva *et al.*, 2013), and that the large clade composed of 35 sequences represents a single species,

E. miyagawai, with a wide geographic distribution (Chai *et al.*, 2021).

Discussion

The actual diversity, host-associations, phylogenetic relationships and distribution of the 'revolutum' species complex within *Echinostoma* have been obscured partially because, in most contributions, authors have relied only on a single line of evidence (e.g. morphology or DNA) to support their species hypotheses, which ultimately rendered a dubious taxonomic status for several species (Georgieva *et al.*, 2014, 2017; Faltýnková *et al.*, 2015; Chai *et al.*, 2020). In the present study, thorough morphological evaluation along with phylogenetic reconstructions based on three loci (nuclear 28S and ITS, and mitochondrial Nad1 markers; the latter also used in the species discovery analyses) made it possible to describe *E. pseudorobustum* sp. nov. from a chicken in Brazil and to confirm its conspecificity with cercariae previously found in *B. glabrata* from the same country identified as *E. robustum* (Detwiler *et al.*, 2010). The results obtained reinforce, as already advocated by others (Georgieva *et al.*, 2014, 2017; Nagataki *et al.*, 2015; Chai *et al.*, 2021), that isolates identified as *E. robustum* from the Americas, in fact, belongs to yet undescribed or molecularly non-characterized species, one of them here described as new. The morphological data for *E. pseudorobustum* sp. nov. clearly separate this species from *E. robustum* *sensu* Yamaguti (1935), currently considered a synonym of *E. miyagawai* (Chai *et al.*, 2021). Moreover, all but one molecular analysis indicates that the other two American isolates identified as *E. robustum* represent two distinct species that need further scrutiny for a better characterization. These two North American isolates were identified after morphological study of experimentally obtained adults (Detwiler *et al.*, 2010), but a detailed morphological description or deposition of vouchers was not provided, hampering the advance in this taxonomic issue. In the last years, new species belonging to the 'revolutum' species complex, some of them with overlapping morphological

Table 2. Comparative data between body length, forebody (FORE%) and post-testicular (TEND%) distance proportional to the body between *Echinostoma pseudorobustum* sp. nov. and *Echinostoma* spp. belonging to the 'revolutum' group reported in South America

Species	Body length (mm)	FORE (%)	TEND (%)	Source
<i>Echinostoma pseudorobustum</i> sp. nov.	10.85–11.49	18.4–19.8	18.4–19.2	This study
<i>Echinostoma barbosai</i>	3.65–7.83	11.6*	36.8*	Lie and Basch (1966)
<i>Echinostoma chloephagae</i>	5.13–6.91	14.7*	30.1*	Sutton and Lunaschi (1980)
<i>Echinostoma erraticum</i>	7–8	17.9*	28.4*	Lutz (1924)
<i>Echinostoma lindoense</i>	12.42–17.2	-	-	Lie (1968)
<i>Echinostoma luisreyi</i>	5.25–6.5	12.3*	38.6*	Maldonado Jr. et al. (2003)
<i>Echinostoma mendax</i>	6–9.5	12.2*	33.3*	Dietz (1910)
<i>Echinostoma microrchis</i>	5	14.7*	33*	Lutz (1924)
<i>Echinostoma neglectum</i>	np	14*	30.1*	Lutz (1924)
<i>Echinostoma nephrocystis</i>	2.5–4.75	18*	27*	Lutz (1924)
<i>Echinostoma paraensei</i>	7.49–16.03	11.3*	35.6*	Lie and Basch (1967)
<i>Echinostoma rodriguesi</i>	3.87–6.8	13.3*	36.4*	Hsu et al. (1968)

Asterisk indicates data taken from original drawings. Measurement not provided or missing drawings are indicated by a dash.

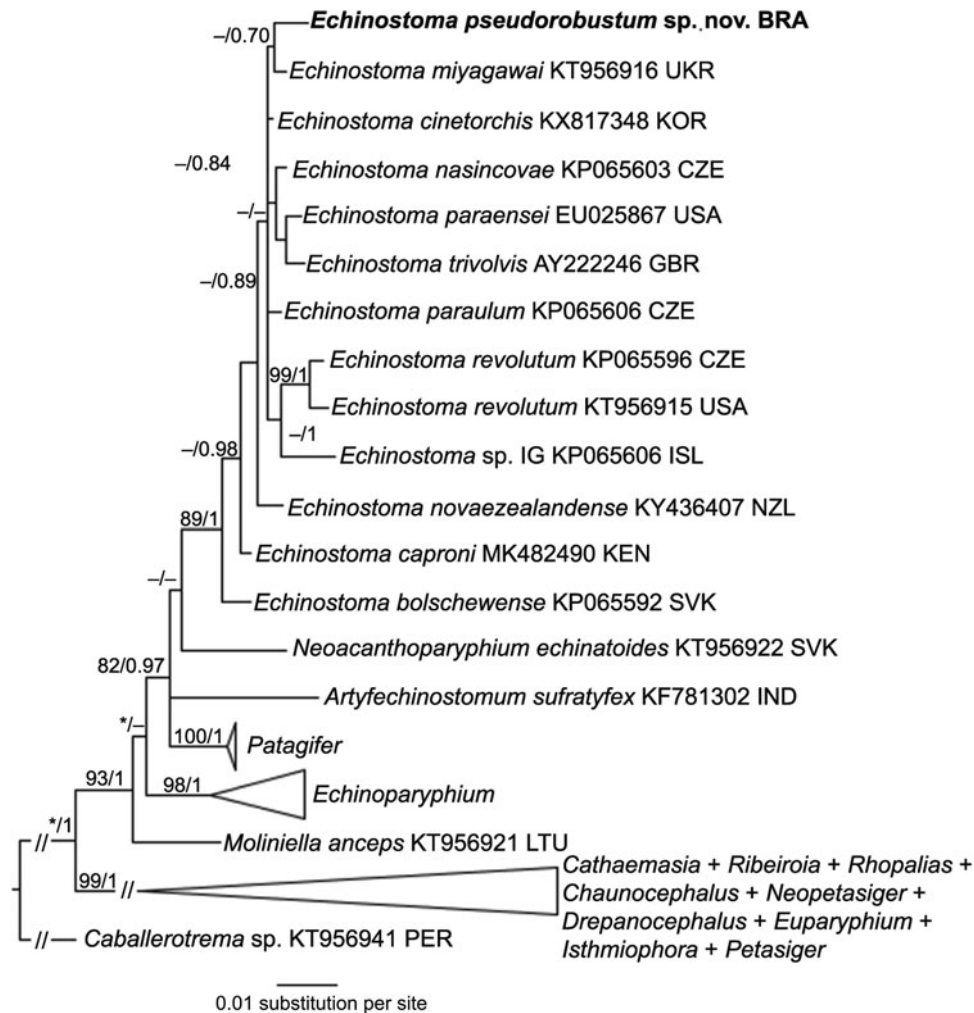


Fig. 3. Phylogenetic relationship between *Echinostoma pseudorobustum* sp. nov. (in bold) and other 37-collar-spined *Echinostoma* species inferred from sequences of 28S rDNA (1063 bp) based on Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) analyses. Nodal support is indicated as ML/BI; values <0.70 (BI) and <70 (ML) are indicated by a dash. BRA, Brazil; UKR, Ukraine; KOR, South Korea; CZE, Czech Republic; USA, United States; GBR, United Kingdom; ISL, Iceland; NZL, New Zealand; KEN, Kenya; SVK, Slovakia; IND, India; LTU, Lithuania; PER, Peru.

characteristics, have been described after molecular studies, 2015; Chai et al., 2021). In South America, 13 species of revealing a greater diversity than previously thought for thisgroup *Echinostoma* have already been described with 37 head collar spines, (Georgieva et al., 2013, 2014, 2017; Faltýnková et al., but molecular studies are extremely scarce. In fact, *E.*

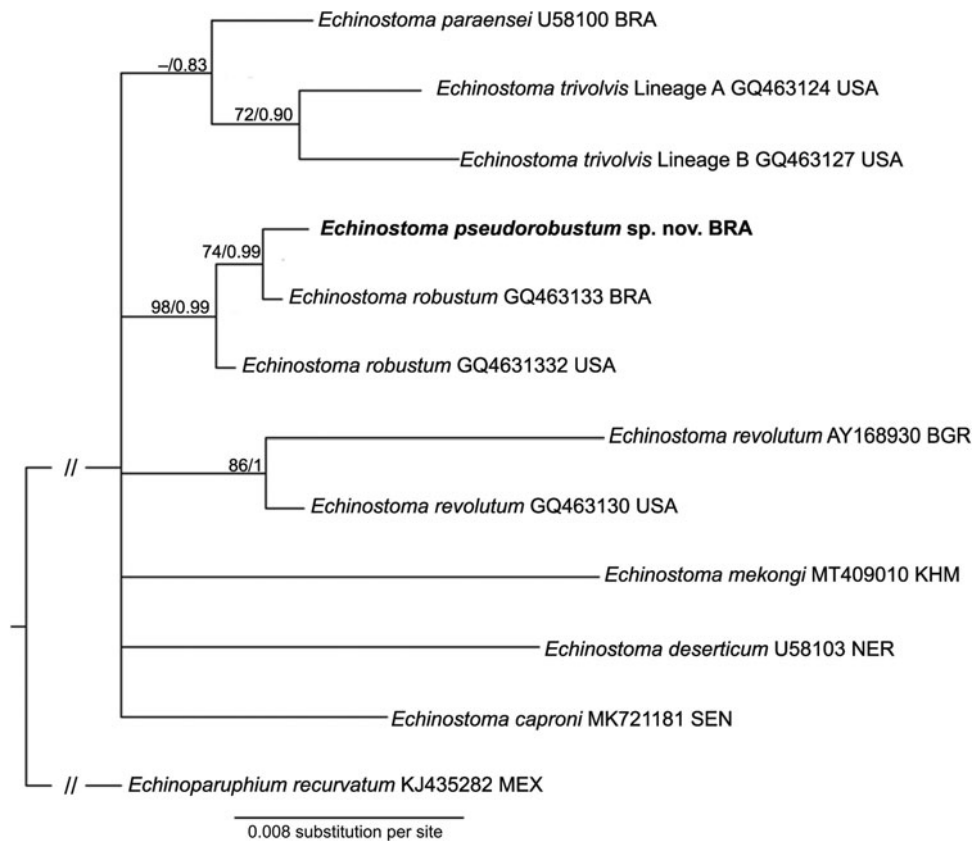


Fig. 4. Phylogenetic relationship between *Echinostoma pseudorobustum* sp. nov. (in bold) and other 37-collar-spined *Echinostoma* species inferred from sequences of internal transcribed spacer (947 bp) based on Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) analyses. Nodal support is indicated as ML/BI; values <0.70(BI) and <70 (ML) are indicated by a dash. BRA, Brazil; USA, United States; BGR, Bulgaria; KHM, Cambodia; NER, Niger; SEN, Senegal; MEX, Mexico.

pseudorobustum sp. nov. is the second species of the genus for which molecular data were generated (the other one is *E. paraensei*). This fact greatly hinders the advance in taxonomic aspects and life cycle, especially considering morphologically similar species. Despite these difficulties, the new species described here can be separated from other South American 37-collar-spined echinostomes by the longest forebody (highest FORE%) and the shortest post-testicular distance (testes in the last quarter of the body, i.e. lowest TEND%).

We recognized that the type and only known definitive host of *E. pseudorobustum* sp. nov., the chicken, a non-native domestic bird, probably is not the main final host for this echinostome species. In fact, the low prevalence of infection and worm burden, ultimately, suggests we are dealing with an accidental host. The process involving spillover of wild hosted echinostomes to chicken was previously reported in the Americas by Mello (1933), even though the identification as *E. revolutum* requires molecular confirmation. Moreover, the experimental susceptibility of *G. g. domesticus* to some South American species of *Echinostoma* (e.g. *E. barbosai*, *E. erraticum*, *E. lindoense* and *E. rodriguezii*) was shown by different authors (Lie and Basch, 1966; Hsu et al., 1968; Lie, 1968; Komma, 1972). Information on the exact environment in which the infected chicken was established is not available. We speculate that it became infected in the rural area of the city, in which the birds are reared in free-ranging system and with access to an aquatic environment containing molluscs or amphibians harbouring echinostome metacercariae. Probably, a wild bird is the natural definitive host of *E. pseudorobustum* sp. nov. Given the natural host of the new species here described is likely distinct from the type-host here described, the existence of some level of host-induced phenotypic plasticity cannot be ruled out. However, clear morphological differences that set the studied specimens

apart from the other *Echinostoma* spp. of the 'revolutum' group (see remarks) hardly could be associated with some host-induced variability. Moreover, a high level of morphological variation has not been reported to other species of *Echinostoma* known from experimental hosts (including chicken) compared to natural hosts (e.g. *E. trivolvis*, *E. caproni* and *E. miyagawai*) (Beaver, 1937; Jeyarasasingam et al., 1972; Fried and Huffman, 1996; Kostadinova et al., 2000). It is also worth mentioning that, yet the validity of the new species is supported by morphological and molecular data, further morphological studies based on a large number of specimens may evidence a wider breadth of intraspecific variability in the taxon but still not overlapping key diagnostic features with other species. The incorrect assignment to some sequences of *Echinostoma* ('revolutum' group) that are available in the GenBank database probably stems from an inaccurate morphological identification of the sequenced isolates. It is also likely true that a finer morphological study combined with molecular findings may reveal that those so-called cryptic species, e.g. the three independent lineages under the same name in the GenBank, *E. trivolvis*, are in fact discrete entities, even morphologically, that each deserves their own name. Therefore, integrated approaches are extremely important to unravel the actual species diversity in *Echinostoma* and make it more reliable information available in the genetic repositories. In the present study, the levels of morphological variation, combined with phylogenetic support, confirm that the clades in which the new species here described as *E. pseudorobustum* sp. nov. nested and the one that grouped the Australasian lineage of *E. miyagawai* represent genetically distinct species.

In general, molecular data have not supported the occurrence of the same species of *Echinostoma* in the New and Old World. For instance, a widely known issue is related to the distribution

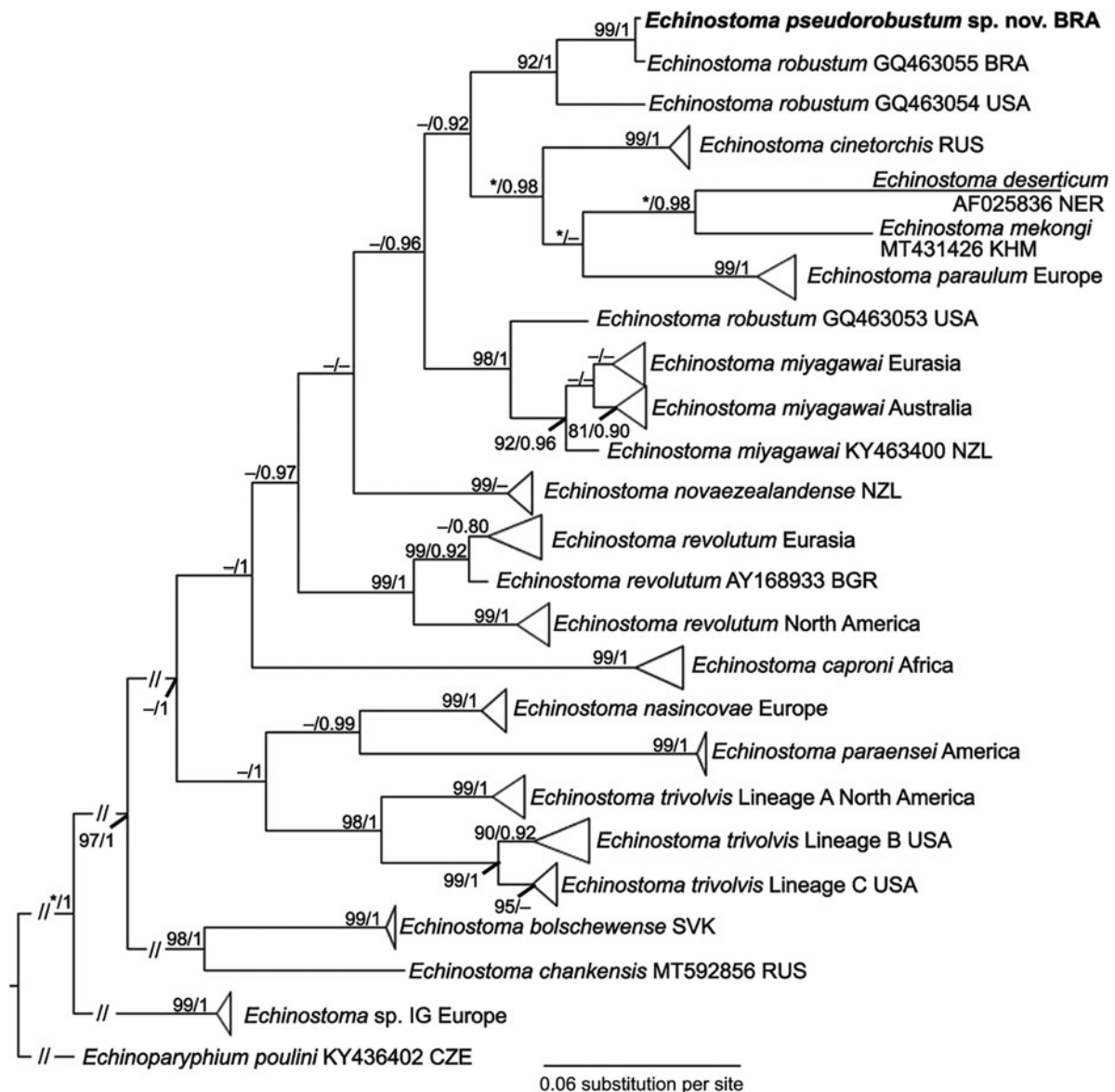


Fig. 5. Phylogenetic relationship between *Echinostoma pseudorobustum* sp. nov. (in bold) and other 37-collar-spined *Echinostoma* species inferred from sequences of mitochondrial Nad1 sequences (442 bp) based on Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) analyses. Nodal support is indicated as ML/BI; values <0.80 (BI) and <80 (ML) are indicated by a dash. BRA, Brazil; USA, United States; RUS, Russia; NER, Niger; KHM, Cambodia; NZL, New Zealand; BGR, Bulgaria; SVK, Slovakia; RUS, Russia; CZE, Czech Republic.

of *E. revolutum* in the Americas, and even in Brazil (Kanev, 1994; Sorensen *et al.*, 1998; Kostadinova *et al.*, 2000, 2003; Detwiler *et al.*, 2010, 2012; Georgieva *et al.*, 2013; Nagataki *et al.*, 2015). Phylogenetic and species delineation analyses, as well as the nucleotide divergence verified among the *E. revolutum* (*sensu stricto*) and the North American isolates, do not support the occurrence of this species in the Americas (Georgieva *et al.*, 2013, 2014, 2017; Nagataki *et al.*, 2015; Mohanta *et al.*, 2019; Chai *et al.*, 2021; present study). Moreover, data obtained in this study also do not support the occurrence of *E. miyagawai* (reported as *E. robustum*) in the Americas, as previously suggested by phylogenetic analysis carried out by different authors (Georgieva *et al.*, 2013, 2014; Nagataki *et al.*, 2015; Mohanta *et al.*, 2019; Chai *et al.*, 2021). An exception to this geographical pattern is the curious finding of a Brazilian species (*E. paraensei*) molecularly identified in Australia (0.3% of divergence in Nad1 in relation to an isolate from the type locality) (Morgan and Blair, 1998a, b). The occurrence of Asian *E. lindoense* in Brazil (Lie, 1968), identified by morphological approach, needs verification, especially including molecular evidence.

Phylogenetic analyses based on the mitochondrial Nad1 gene were found to be effective in exploring the interrelationships and intraspecific variability among 37-collar-spined echinostomes, also revealing congruence with available morphological data (Morgan and Blair, 1998b; Georgieva *et al.*, 2017). Owing to its high evolutionary rate, the probability of detecting diagnostic characters among closely related species increases (Vilas *et al.*, 2005), which seems the case for the unambiguous differentiation between the new species and its sister taxon '*E. robustum*' lineage C of Detwiler *et al.* (2010), a result not achieved using the ITS dataset alone. In a recent study that included comprehensive multi-gene phylogenetic analyses for the Echinostomatidae, Izrailskaya *et al.* (2021) suggested that the Cox-1 gene might be more promising for tackling taxonomic issues in this family due to its uniform accumulation of mutations across lineages, unlike the variable rates of mutation of the Nad1 gene. They draw this conclusion chiefly based on the lack of significant genetic variation (using Nad1) between isolates of *E. miyagawai* from East Asia and Europe that exhibit differences in the cercariae morphology and time to maturation, suggesting that Nad1 does not provide

enough phylogenetic signal for the distinction between these closely related lineages. However, considering the substantial body of evidence for the utility of the Nad1 in unravelling the interrelations of *Echinostoma* spp. (Georgieva *et al.*, 2013, 2014, 2017; Chai *et al.*, 2021, present study), which in many cases corroborates the morphological data, further studies based on a wider taxon coverage for Cox-1 data, obviously including isolates of

E. miyagawai from Europe, should be performed before accepting such assumption. Ideally, gathering complete mitogenomes may indicate more precisely which genes are more reliable and informative (individually or in concatenated analyses); currently, complete mitogenome is available only to four species, i.e. *E. caproni*, *E. miyagawai*, *E. paraensei* and *E. revolutum*, and mostly used to assess higher-level phylogenetic relationships (Fu *et al.*, 2019; Le *et al.*, 2020).

The species delimitation methods handle one of the most problematic issues in describing the biological diversity, which is identifying taxa at the species level (Carstens *et al.*, 2013). Even though these approaches cannot be considered the panacea to the species problem, a bulk of methods have been recently employed to strengthen the hypotheses delineated from more traditional pieces of evidence (e.g. morphology, ecology and behaviour), and often unravelling cryptic diversity (Carstens *et al.*, 2013). Two categories of species delimitation methods can be recognized: the species discovery, such as the GMYC, PTP and ASAP, which do not require prior assignments for the putative species, and the species validation ones, which demand the discrimination of the lineages *a priori* (e.g. *BEAST, BPP, spedeTEM) (Carstens *et al.*, 2013; da Cruz and Weksler, 2018). Both strategies have been recently used for parasitic helminths such as trematodes (Pérez-Ponce de León *et al.*, 2016), acanthocephalans (Pinacho-Pinacho *et al.*, 2018), nematodes (Ailán-Choke *et al.*, 2020) and cestodes (Alves *et al.*, 2021), and their usefulness is acknowledged in these works. In the present study, the species discovery methods were useful to confirm the conspecificity between our newly sequenced specimen of *E. pseudorobustum* sp. nov. with the Brazilian isolate previously found in the first intermediate host (GQ463055), and to refute the occurrence of

E. miyagawai in the Americas, as previously suggested by other authors (Georgieva *et al.*, 2013, 2014; Chai *et al.*, 2021). Even though Izrail'skaia *et al.* (2021) suggested that isolates identified as *E. revolutum* from North America and Eurasia represent a single species, the results obtained reported them as independent lineages similarly as found by other workers (Georgieva *et al.*, 2014, 2017; Chai *et al.*, 2021). The differences observed in the number of species recognized by the mPTP (18), ASAP (19) and bPTP (20) are expected as each method has its own limitations, e.g. overlumping or oversplitting (Dellicour and Flot, 2018; Puillandre *et al.*, 2021), therefore incongruencies among them are common (Carstens *et al.*, 2013). Considering the amount of genetic divergence between the two Brazilian isolates, including the newly generated one, and the poorly known North American isolate GQ463054, we do not consider the latter isolated in our concept of *E. pseudorobustum* as suggested by the mPTP analysis, yet this decision needs verification based on adult specimens for allowing morphological comparisons, and higher taxon sampling (accounting for the intraspecific variability) to be more useful for certain species delimitation methods.

Integrative taxonomy approach in the study of species of *Echinostoma* from South America is in its infancy. New broader approach studies are necessary to advance the knowledge of life history and host-parasite relationship involving this complex group of trematodes. Besides the description of a new species, data presented here suggest that *E. miyagawai* (= *E. robustum*) must be considered a species with distribution restricted to Eurasia and Oceania, not occurring in New World.

Supplementary material. The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S0031182021001864>.

Author contribution. M.C.V., P.V.A. and H.A.P. conceived and designed the study. M.C.V. conducted fieldwork. M.C.V., D.L.H. and P.V.A. performed molecular and phylogenetic analyses. M.C.V., D.L.H., P.V.A. and H.A.P. wrote the article. H.A.P. supervising, reviewing and editing the article.

Financial support. This work was also supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil (research scholarship to H.A.P.) and the National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES), Brazil (student scholarship to M.C.V. and D.L.H. and post-doctoral scholarship to P.V.A.).

Conflict of interest. None.

Ethical standards. The use of parasites from chickens was in accordance with the local animal research ethics committees of Universidade Federal de Viçosa (protocol CEUA/UFV 69/2017).

References

- Ailán-Choke LG, Tavares LER, Luque JL and Pereira FB (2020) An integrative approach assesses the intraspecific variations of *Procamallanus* (*Spirocamallanus*) *inopinatus*, a common parasite in Neotropical freshwater fishes, and the phylogenetic patterns of Camallanidae. *Parasitology* **147**, 1752–1764.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403–410.
- Alves PV, de Chambrier A, Luque JL and Scholz T (2021) Integrative taxonomy reveals hidden cestode diversity in *Pimelodus* catfishes in the Neotropics. *Zoologica Scripta* **50**, 210–224.
- Beaver PC (1937) Experimental studies on *Echinostoma revolutum* (Frölich) a fluke from birds and mammals. *Illinois Biological Monographs* **15**, 96 pp.
- Blair C and Bryson RW Jr (2017) Cryptic diversity and discordance in single-locus species delimitation methods within horned lizards (Phrynosomatidae: Phrynosoma). *Molecular Ecology Resources* **17**, 1168–1182.
- Carstens BC, Pelletier TA, Reid NM and Sattler JD (2013) How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology* **22**, 4369–4383.
- Chai JY, Cho J, Chang T, Jung BK and Sohn WM (2020) Taxonomy of *Echinostoma revolutum* and 37-collar-spined *Echinostoma* spp.: a historical review. *Korean Journal of Parasitology* **58**, 343–371.
- Chai JY, Jung BK, Chang T, Shin H, Cho J, Ryu JY, Kim HS, Park K, Jeong MH, Hoang EH and Abullah MBM (2021) *Echinostoma miyagawai* Ishii, 1932 (Echinostomatidae) from ducks in Aceh Province, Indonesia with special reference to its synonym with *Echinostoma robustum* Yamaguti, 1935. *Korean Journal of Parasitology* **59**, 35–45.
- da Cruz MOR and Weksler M (2018) Impact of tree priors in species delimitation and phylogenetics of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia: Cricetidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **119**, 1–12.
- Dellicour S and Flot JF (2018) The hitchhiker's guide to single-locus species delimitation. *Molecular Ecology Resources* **18**, 1234–1246.
- Detwiler JT, Bos DH and Minchella DJ (2010) Revealing the secret lives of cryptic species: examining the phylogenetic relationships of echinostome parasites in North America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **55**, 611–620.
- Detwiler JT, Zajac AM, Minchella DJ and Belden LK (2012) Revealing cryptic parasite diversity in a definitive host: echinostomes in muskrats. *Journal of Parasitology* **98**, 1148–1155.
- Dietz E (1910) Die Echinostomiden der Vögel. *Zoologische Jahrbücher* **12**, 265–512.
- Esteban JG and Muñoz-Antoli C (2009) Echinostomes: systematics and life cycles. In Fried B and Toledo R (eds), *The Biology of Echinostomes: From the Molecule to the Community*. New York, USA: Springer Science + Business Media, pp. 1–34.
- Faltýnková A, Georgieva S, Soldánová M and Kostadinova A (2015) Reassessment of species diversity within the 'revolutum' group of *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) in Europe. *Systematic Parasitology* **90**, 1–25.
- Fried B and Graczyk TK (2004) Recent advances in the biology of *Echinostoma* species in the 'revolutum' group. *Advances in Parasitology* **58**, 139–195.

- Fried B and Huffman JE** (1996) The biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. *Advances in Parasitology* **38**, 311–368.
- Fu YT, Jin YC, Li F and Liu GH** (2019) Characterization of the complete mitochondrial genome of the echinostome *Echinostoma miyagawai* and phylogenetic implications. *Parasitology Research* **118**, 3091–3097.
- Georgieva S, Selbach C, Faltýnková A, Soldánová M, Sures B, Skirnisson K and Kostadinova A** (2013) New cryptic species of the 'revolutum' group of *Echinostoma* (Digenea: Echinostomatidae) revealed by molecular and morphological data. *Parasites & Vectors* **6**, 64.
- Georgieva S, Faltýnková A, Brown R, Blasco-Costa I, Soldánová M, Sitko J, Scholz T and Kostadinova A** (2014) *Echinostoma* 'revolutum' (Digenea: Echinostomatidae) species complex revisited: species delimitation based on novel molecular and morphological data gathered in Europe. *Parasites & Vectors* **7**, 520.
- Georgieva S, Blasco-Costa I and Kostadinova A** (2017) Molecular characterization of four echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) from birds in New Zealand, with descriptions of *Echinostoma novaezealandense* n. sp. and *Echinoparyphium poulini* n. sp. *Systematic Parasitology* **94**, 477–497.
- Heneberg P** (2020) Taxonomic comments on the validity of *Echinostoma miyagawai* Ishii, 1932 (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitology International* **74**, 101931.
- Hsu KC, Lie KJ and Basch PF** (1968) The life history of *Echinostoma rodri-guesi* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). *Journal of Parasitology* **54**, 333–339.
- Ishii N** (1932) Studies on bird trematodes. I. *Jikken Igaku Zasshi* **16**, 1205–1231.
- Izraïlskaia AV, Besprozvannykh VV and Tatonova YV** (2021) *Echinostoma chankensis* nom. nov., other *Echinostoma* spp. and *Isthmiophora hortensis* in East Asia: morphology, molecular data and phylogeny within Echinostomatidae. *Parasitology* **148**, 1366–1382.
- Jeyarasasingam U, Heyneman D, Lim H-K and Mansoul N** (1972) Life cycle of a new echinostome from Egypt, *Echinostoma lei* sp. nov. (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitology* **65**, 203–222.
- Kanev I** (1994) Life cycle, delimitation and redescription of *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) (Trematoda: Echinostomatidae). *Systematic Parasitology* **28**, 125–144.
- Kapli P, Lutteropp S, Zhang J, Kobert K, Pavlidis P, Stamatakis A and Flouri T** (2017) Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics* **33**, 1630–1638.
- Komma MD** (1972) Revalidação da espécie *Echinostoma erraticum*, (Lutz, 1924). *Revista de Patologia Tropical* **1**, 463–471.
- Kostadinova A** (2005) Family Echinostomatidae Looss, 1899. In Jones A, Gibson DI and Bray R (eds), *Keys to the Trematoda*. Volume 2. London, UK: CABI Publishing and The Natural History Museum, pp. 9–64.
- Kostadinova A and Gibson DI** (2000) The systematics of the echinostomes. In Fried B and Graczyk TK (eds), *Echinostomes as Experimental Models for Biological Research*. Dordrecht: Kluwer, pp. 31–57.
- Kostadinova A, Gibson DI, Biserkov V and Chipev N** (2000) Re-validation of *Echinostoma miyagawai* Ishii, 1932 (Digenea: Echinostomatidae) on the basis of the experimental completion of its life-cycle. *Systematic Parasitology* **45**, 81–108.
- Kostadinova A, Herniou EA, Barret J and Littlewood DTJ** (2003) Phylogenetic relationships of *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) and related genera re-assessed via DNA and morphological analyses. *Systematic Parasitology* **54**, 159–176.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Nkayaz C and Tamura K** (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**, 1547–1549.
- Le TH, Pham LTK, Doan HTT, Le XTK, Saijuntha W, Rajapakse RJ and Lawton SP** (2020) Comparative mitogenomics of the zoonotic parasite *Echinostoma revolutum* resolves taxonomic relationships within the 'E. revolutum' species group and the Echinostomata (Platyhelminthes: Digenea). *Parasitology* **147**, 566–576.
- Li Y, Qiu YY, Zeng MH, Diao PW, Chang QC, Gao Y, Zhang Y and Wang CR** (2019) The complete mitochondrial genome of *Echinostoma miyagawai*: comparisons with closely related species and phylogenetic implications. *Infection, Genetics and Evolution* **75**, 103961.
- Lie KJ** (1968) Further studies on the life history of *Echinostoma lindoense* Sandground and Bonne, 1940 (Trematoda: Echinostomatidae) with a report of its occurrence in Brazil. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* **35**, 74–77.
- Lie KJ and Basch PF** (1966) Life history of *Echinostoma barbosaensis* n. (Trematoda: Echinostomatidae). *Journal of Parasitology* **52**, 1052–1057.
- Lie KJ and Basch PF** (1967) The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). *Journal of Parasitology* **53**, 1192–1199.
- Luton K, Walker D and Blair D** (1992) Comparison of ribosomal internal transcribed spacer from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology* **56**, 323–328.
- Lutz A** (1924) Estudos sobre a evolução dos endotrematódeos brasileiros. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **17**, 55–57.
- Maldonado Jr A, Loker ES, Morgan JAT, Rey L and Lanfredi RM** (2001) Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. *Parasitology Research* **87**, 840–848.
- Maldonado Jr A, Vieira GO and Lanfredi RM** (2003) *Echinostoma luisreyi* n. sp. (Platyhelminthes: Digenea) by light and scanning electron microscopy. *Journal of Parasitology* **89**, 800–808.
- Mello A** (1933) Da ocorrência de *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802) em *Gallus domesticus* no Brasil. *Archivos da Escola Superior de Agricultura e Medicina Veterinária* **10**, 172.
- Mohanta UK, Watanabe T, Anisuzzaman, Ohari Y and Itagaki T** (2019) Characterization of *Echinostoma revolutum* and *Echinostoma robustum* from ducks in Bangladesh based on morphology, nuclear ribosomal ITS2 and mitochondrial nad1 sequences. *Parasitology International* **69**, 1–7.
- Morgan JAT and Blair D** (1995) Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group. *Parasitology* **111**, 609–615.
- Morgan JAT and Blair D** (1998a) Mitochondrial ND1 gene sequences used to identify echinostome isolates from Australia and New Zealand. *Internal Journal for Parasitology* **28**, 493–502.
- Morgan JAT and Blair D** (1998b) Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacers and mitochondrial CO1 and ND1 genes for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda). *Parasitology* **116**, 289–297.
- Nagataki M, Tantrawatpan C, Agatsuma T, Sugiura T, Duenngai K, Sithithaworn P, Andrews RH, Petney TN and Saijuntha W** (2015) Mitochondrial DNA sequences of 37 collar-spined echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) in Thailand and Lao PDR reveals presence of two species: *Echinostoma revolutum* and *E. miyagawai*. *Infection, Genetics and Evolution* **35**, 56–62.
- Pérez-Ponce de León G, García-Varela M, Pinacho-Pinacho CD, Sereno-Urbe AL and Poulin R** (2016) Species delimitation in trematodes using DNA sequences: Middle-American *Clinostomum* as a case study. *Parasitology* **143**, 1773–1789.
- Pinacho-Pinacho CD, García-Varela M, Sereno-Urbe AL and Pérez-Ponce de León G** (2018) A hyper-diverse genus of acanthocephalans revealed by tree-based and non-tree-based species delimitation methods: ten cryptic species of *Neoechinorhynchus* in Middle American freshwater fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **127**, 30–45.
- Pleijel F, Jondelius U, Norlinder E, Nygren A, Oxelman B, Schander C, Sundberg P and Thollesson M** (2008) Phylogenies without roots? A plea for the use of vouchers in molecular phylogenetic studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **48**, 369–371.
- Puillandre N, Brouillet S and Achaz G** (2021) ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources* **21**, 609–620.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA and Huelsenbeck JP** (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**, 539–542.
- Sandground JH and Bonne C** (1940) *Echinostoma lindoensis* n. sp., a new parasite of man in the Celebes with an account of its life history and epidemiology. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **20**, 511–535.
- Sorensen RE, Curtis J and Minchella DJ** (1998) Intraspecific variation in the rDNA ITS loci of 37-collar-spined echinostomes from North America: implication for sequence-based diagnoses and phylogenetics. *Journal of Parasitology* **84**, 992–997.
- Sutton CA and Lunaschi L** (1980) Contribución al conocimiento de la fauna parasitológica argentina VII. Nuevo digéneo en *Chloephaga picta leucoptera* (Gmelin). *Neotropica* **26**, 13–17.

- 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.
- Tkach VV, Kudlai O and Kostadinova A** (2016) Molecular phylogeny and systematics of the Echinostomatoidea Looss, 1899 (Platyhelminthes: Digenea). *International Journal for Parasitology* **46**, 1–15.
- Toledo R, Muñoz-Antoli C and Esteban JG** (2000) The life-cycle of *Echinostoma friedi* n. sp. (Trematoda: Echinostomatidae) in Spain and a discussion on the relationships within the 'revolutum' group based on cercarial chaetotaxy. *Systematic Parasitology* **45**, 199–207.
- Toledo R, Radev V, Kanev I, Gardner SL and Fried B** (2014) History of Echinostomes (Trematoda). *Acta Parasitologica* **59**, 553–565.
- Vilas R, Criscione CD and Blouin MS** (2005) A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology* **131**, 839–846.
- Yamaguti S** (1935) Studies on the helminth fauna of Japan. Part 5. Trematodes of birds, III. *Japanese Journal of Zoology* **6**, 159–182.
- Zhang J, Kapli P, Pavlidis P and Stamatakis A** (2013) A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* **29**, 2869–28

Capítulo 2: A new cryptic species of *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) closely related to *Echinostoma paraensei* found in Brazil

Artigo publicado na revista *Parasitology* 150: 337–347, 2023. doi: 10.1017/S003118202300001X

Este trabalho teve como objetivo principal caracterizar através de estudos morfológico e molecular, uma espécie de *Echinostoma* obtida a partir de *S. marmorata* infectados naturalmente no município de Alvorada de Minas, Minas Gerais, Brasil. Também foi conduzida uma infecção experimental em *Meriones unguiculatus* (Milne-Edwards, 1867) a fim de recuperar exemplares adultos para estudos morfológicos.

Research Article

Cite this article: Valadão MC, Alves PV, López-Hernández D, Assis JCA, Coelho PRS, Geiger SM, Pinto HA (2023). A new cryptic species of *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) closely related to *Echinostoma paraensei* found in Brazil. *Parasitology* 1–11. <https://doi.org/10.1017/S003118202300001X>

Received: 29 September 2022

Revised: 22 December 2022

Accepted: 24 December 2022

Keywords:





Brazil; cryptic species; *Echinostoma*; integrative taxonomy; phylogeny

Author for correspondence:

Hudson A. Pinto,

E-mail: HUDSONALVES13@ICB.UFMG.BR

A new cryptic species of *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) closely related to *Echinostoma paraensei* found in Brazil

Marisa C. Valadão¹, Philippe V. Alves^{1,2} , Danimar López-Hernández¹, Jordana C. A. Assis¹ , Paulo R. S. Coelho¹, Stefan M. Geiger¹  and Hudson A. Pinto¹ 

¹Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, P.O. Box 486, 30123-970, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil and ²Section of Parasitology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), 18618-689, Botucatu, São Paulo, Brazil

Abstract

Echinostoma paraensei, described in Brazil at the end of the 1960s and used as a biological model for a range of studies, belongs to the ‘*revolutum*’ complex of *Echinostoma* comprising species with 37 collar spines. However, molecular data are available only for a few isolates maintained under laboratory conditions, with molecular prospecting based on specimens originating from naturally infected hosts virtually lacking. The present study describes *Echinostoma maldonadoi* Valadão, Alves & Pinto n. sp., a species cryptically related to *E. paraensei* found in Brazil. Larval stages (cercariae, metacercariae and rediae) of the new species were found in the physid snail *Stenophysa marmorata* in the State of Minas Gerais, Brazil, the same geographical area where *E. paraensei* was originally described. Adult parasites obtained experimentally in *Meriones unguiculatus* were used for morphological (optical microscopy) and molecular [28S, internal transcribed spacer (ITS), *nad1* and *cox1*] characterization. The morphology of larval and adult parasites (most notable the small-sized dorsal spines in the head collar), associated with low (0–0.1%) molecular divergence for 28S gene or ITS region, and only moderate divergence for the mitochondrial *cox1* gene (3.83%), might suggest that the newly collected specimens should be assigned to *E. paraensei*. However, higher genetic divergence (6.16–6.39%) was found in the mitochondrial *nad1*, revealing that it is a genetically distinct, cryptic lineage. In the most informative phylogenetic reconstruction, based on *nad1*, *E. maldonadoi* n. sp. exhibited a strongly supported sister relationship with *E. paraensei*, which may indicate a very recent speciation event giving rise to these 2 species.

Introduction

Species of the genus *Echinostoma* Rudolphi, 1809 are digenetic trematodes found, in the adult stage, in the intestine of birds and mammals, including humans (Fried and Graczyk, 2000; Toledo *et al.*, 2009; Chai *et al.*, 2020). More than 120 nominal species have been described worldwide making it the most diverse genus in the Echinostomatidae (Kostadinova and Gibson, 2000), but the pronounced morphological uniformity among species, along with other historical issues, has led to a complex taxonomic scenario. This is particularly true for the ‘*revolutum*’ group, formed by species of *Echinostoma* possessing 37 collar spines. About 60 nominal species were described worldwide (Chai *et al.*, 2020), but the validity of most of them still requires confirmation, given that this group has been subjected to intense debate and constant taxonomic rearrangements over time (Georgieva *et al.*, 2013, 2014; Faltýnková *et al.*, 2015).

In the last decades, the use of molecular tools has revealed the existence of numerous independent evolutionary lineages of *Echinostoma*, usually referred to as cryptic species, but also has helped to unravel the correct identity of previously known taxa, some of them described as new (Detwiler *et al.*, 2010; Georgieva *et al.*, 2013, 2014, 2017; Faltýnková *et al.*, 2015; Izrailskaia *et al.*, 2021; Valadão *et al.*, 2022). These recent advances have contributed to a better knowledge of the species composition and the distribution of these parasites and have generated evidence on their biogeography, evolution and radiation. However, such integrative taxonomic studies involving *Echinostoma* spp. are disproportionately carried out in Asia, Europe and North America (Detwiler *et al.*, 2010; Georgieva *et al.*, 2014; Chai *et al.*, 2021). In fact, in South America, molecular studies involving species of *Echinostoma* are scarce (Maldonado *et al.*, 2001a; Valadão *et al.*, 2022) and do not reflect the diversity of species known in this subcontinent (more than 30 species, 12 bearing 37 collar spines) (Travassos *et al.*, 1969; Fernandes *et al.*, 2015; Lunaschi *et al.*, 2018; Valadão *et al.*, 2022).

Among the species belonging to the ‘*revolutum*’ group is *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967, described based on adult parasites recovered in the course of experimental studies initiated from naturally infected *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) collected in Brazil. The main differential trait of the species is the relatively small size of the dorsal collar spines

(Lie and Basch, 1967). Some decades later, the semi-aquatic rodent, *Nectomys squamipes* (Brants, 1827), was identified as a natural definitive host in Brazil (Maldonado *et al.*, 2001a). The life cycle of the species is maintained under laboratory conditions in the USA and Brazil (Toledo and Fried, 2005; Fried and Peoples, 2009), which made it possible to carry out several biological studies involving *E. paraensei*. These studies contributed to the knowledge of several aspects related to this species, including (i) parasite behaviour (e.g. Loker *et al.*, 1987; Nollen, 1996; Maldonado *et al.*, 2005), (ii) parasite interaction (in both intramolluscan and vertebrate phases) with *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 and/or other echinostomes (e.g. Sullivan and Richards, 1981; Combes, 1982; Maldonado *et al.*, 2001b; Garcia *et al.*, 2010; Hanington *et al.*, 2010), (iii) ultrastructural morphology of different developmental stages (e.g. Fujino *et al.*, 2000; Maldonado *et al.*, 2001a; Pinheiro *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2017a), (iv) biochemical and pathological changes associated with the infection in molluscs and rodents (e.g. Adema *et al.*, 2000; Toledo, 2009; Garcia *et al.*, 2011, 2021; Souza *et al.*, 2017a), (v) parasite protein composition (proteomics) (e.g. Loker *et al.*, 1992; Marcilla, 2009) and (vi) sequencing of expressed sequence tags (Adema *et al.*, 2000; Nowak and Loker, 2005).

Despite this tremendous scientific knowledge accumulated over decades about *E. paraensei*, studies on the molecular characterization of the species are scarce. Considering genetic markers, commonly used in taxonomic studies of trematodes, few sequences generated for *E. paraensei* are available in the public genetic sequence databases. They correspond to the complete mitochondrial genome of the isolate maintained under laboratory conditions in the USA (KT008005 – Adema *et al.*, direct submission in GenBank®, unpublished), some internal transcribed spacer (ITS) sequences generated for the Brazilian isolate from *N. squamipes* (Maldonado *et al.*, 2001a) and *nad1* sequences obtained for larval stages found in Australia and for the isolate originated from Brazil and maintained in the USA (Morgan and Blair, 1998a).

In the present study, we provide data obtained during experimental, morphological and molecular studies of a 37-collar-spined echinostome found in *Stenophysa marmorata* (Guilting, 1828) from Brazil. Despite the morphological data of the developmental stages and sequences of nuclear genetic markers (28S and ITS) suggested that the parasite is indistinguishable from *E. paraensei*, mitochondrial data (*nad1* gene) pointed to a genetically distinct lineage, herein described as a new species of *Echinostoma*.

Materials and methods

Sampling and experimental infection

The isolate of the parasite evaluated in this study was obtained from a specimen of *S. marmorata* collected in the municipality of Alvorada de Minas, Minas Gerais, Brazil, in February 2019 during a malacological survey focused on the epidemiology of schistosomiasis. Details of malacological techniques and preliminary evaluation of infection with larval trematodes are as described in Coelho *et al.* (2021, 2022). The infected snail was sent to the laboratory for further parasite identification. A new photostimulation test was carried out for the recovery of cercariae. The infected mollusc died on the following day and was dissected for retrieval of rediae and metacercariae. This fact precludes us from providing detailed illustrations of larval stages.

For the recovery of adult parasites, part of the collected metacercariae were used to infect a laboratory-reared jird, *Meriones unguiculatus* (Milne-Edwards, 1867). The rodent was orally inoculated with approximately 60 metacercariae. The infected animal was submitted to an immunosuppression protocol through

subcutaneous inoculation of dexamethasone disodium phosphate (Decadron, Ache, Brazil), 25 mg kg⁻¹, daily until the end of the experiment. The success of infection was verified by fecal examination through the spontaneous sedimentation method (Lutz, 1919) from 7 days post-infection (dpi) onwards. The animal was kept in the laboratory with water and food provided *ad libitum* until the euthanasia carried out at 15 dpi. The intestine was transferred to Petri dishes containing physiological saline (0.85% NaCl) and examined under a stereomicroscope for the presence of adult or juvenile parasites.

Morphological study

Samples of the emerged cercariae were stained with vital stains (0.05% neutral red or Nile blue sulphate) and mounted in temporary preparations for examination under a light microscope. Larvae were also killed in hot water and fixed in 10% formalin for morphometric analysis. Rediae and metacercariae were studied live in temporary preparations and then also fixed in 10% formalin. Adult parasites collected from the experimentally infected jird were individually compressed between glass slides and fixed in 10% formalin. Later, they were stained with alum acetocarmine, dehydrated in an increasing series of ethanol, clarified in beechwood creosote and mounted on permanent slides with Canada balsam. For the study of the cephalic collar, some specimens had their anterior extremity sectioned with the aid of a scalpel blade, transferred to a glass slide and clarified with Amman's lactophenol. The preparations were examined under the microscope for determination of the number, size, shape and arrangement of collar spines, according to Fried *et al.* (2009). Whole adult parasites were photographed using a digital camera Samsung® ES70 (Samsung, Brazil), coupled to a stereomicroscope. Details of structures of adults and the larval stages were photographed with a Leica ICC50 HD digital camera, coupled to a Leica DM500 microscope. Captured images were analysed with Leica Application Suite software (LAZ EZ), version 2.0 (Leica Microsystems, Germany). The drawings were made with the aid of a camera lucida connected to an Olympus BH-2 microscope (Olympus, Japan). The morphometric analyses were carried out using a micrometre eyepiece. The abbreviations used in the morphological descriptions are in accordance with the most recent descriptions of *Echinostoma* (Kostadinova, 2005; Faltýnková *et al.*, 2015; Georgieva *et al.*, 2017). In the case of dorsal spines (DLSL, length of the dorsolateral spines; DMSL, length of the most dorsal spines), we used the terminology presented by Maldonado *et al.* (2001a). Data obtained were compared with descriptions available to *Echinostoma* spp. reported in South America (Lie and Basch, 1967; Travassos *et al.*, 1969; Maldonado *et al.*, 2001a, 2003; Fernandes *et al.*, 2015).

The type material is deposited in the Helminthological Collection of the Institute Oswaldo Cruz (CHIOC) and Collection of Trematodes of the Federal University of Minas Gerais (UFMG-TRE).

Molecular study

An adult specimen fixed in 95% ethanol was used for DNA extraction using the QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, USA), according to manufacturers' instructions. The concentration and quality of extracted DNA was evaluated using the microvolume spectrophotometer NanoDrop® Lite (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). Partial regions of 28S rRNA gene (primers Dig-12/1500R; Tkach *et al.*, 2003), ITS1-5.8S-ITS2 regions (primers BD1/BD2; Luton *et al.*, 1992), *cox1* gene (JB3/CO1-R trema; Miura *et al.*, 2005) and *nad1* gene (primers NDJ11/NDJ2a; Kostadinova *et al.*, 2003) were amplified by PCR. The amplification reactions

were carried out in a final volume of 25 μ L, including 12.5 μ L of Platinum Hot Start Master Mix 2 \times (Invitrogen, ThermoFisher Scientific Baltics, Vilnius, Lithuania), 1.25 pmol of each primer, about 50 ng of template DNA and sterile ddH₂O. PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel, and the band of the expected size was purified with 20% polyethylene glycol 8000 (Promega, Madison, WI, USA). Purified DNA was sequenced in both directions by capillary electrophoresis in an ABI3730 sequencer using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The chromatograms obtained were assembled using ChromasPro v.2.0.1 software (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Queensland, Australia) and the generated contiguous sequences used in the subsequent analyses.

The newly generated sequences were first subjected to a search in the Basic Local Alignment Search Tool – BLAST (Altschul *et al.*, 1990) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) in GenBank. Data obtained for the 4 molecular markers evaluated were compared exclusively with congeneric species. Alignment constructions were performed using the algorithm MUSCLE implemented in the software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Before phylogenetic analyses, alignments were trimmed to match the shortest sequence. The evolutionary models used for the analyses were estimated by the Bayesian information criterion implemented in MEGA X. Outgroups for each dataset were chosen based on previous molecular phylogenetic studies including representatives of *Echinostoma* and related taxa (Serenó-Uribe *et al.*, 2015; Tkach *et al.*, 2016; Georgieva *et al.*, 2017; Nakao and Sasaki, 2021). The methods used to generate the phylogenetic hypotheses were maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (IB). ML analyses were performed in MEGA X and nodal support was measured using the bootstrap test with 1000 replicates. BI analyses were performed with MrBayes v.3.2.6 software (Ronquist *et al.*, 2012) and posterior probability values were determined by the Monte Carlo method *via* Markov chains, in 2 simultaneous runs of 4 chains for 10⁶ generations, with topologies sampling every 100 generations. The 'burn-in' was established for the first 25% of the trees sampled, and the nodal support was estimated from the remaining trees. The trees obtained by BI were visualized with FigTree software version 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) and edited in Adobe Photoshop® v.22.4.3 software (Adobe Inc., USA). All sequences generated in this study were deposited in GenBank under the accession numbers OQ132569 (28S), OQ132538 (ITS1-5.8S-ITS2), OQ134393 (*cox1*) and OQ126877 (*nad1*).

Results

A total of 56 specimens of a 37-collar-spined *Echinostoma* were recovered from the small intestine of *M. unguiculatus* 15 days after the experimental infection with metacercariae, obtained from *S. marmorata*. The obtained morphological and molecular data pointed to a new species of *Echinostoma* from the 'revolutum' group, which is described below.

Family Echinostomatidae Looss, 1899

Genus *Echinostoma* Rudolphi, 1809

Echinostoma maldonadoi Valadão, Alves & Pinto n. sp.

Natural intermediate host: *Stenophysa marmorata* (Guilding, 1828) (Gastropoda: Physidae)

Prevalence of infection: 1/224 (0.45%).

Experimental definitive host: *Meriones unguiculatus* (Milne-Edwards, 1867) (Rodentia: Muridae).

Natural definitive host: unknown.

Type locality: Alvorada de Minas (18°43'7" S 43°22'5" W), Minas Gerais, Brazil

Type material: Holotype (CHIOC 39915 a); paratypes (5 specimens, CHIOC 39915 b-f and 10 specimens, UFMG–TRE UFMG-TRE 133).

Representative DNA sequences: 28S (OQ132569), ITS1-5.8S-ITS2 (OQ132538), *cox1* (OQ134393) and *nad1* (OQ126877).

ZooBank registration: urn:lsid:zoobank.org:pub:2A535C25-8E19-4716-8E6F-B94AC683A7C6

Etymology: The specific name *maldonadoi* is given to honour the Brazilian helminthologist, Dr. Arnaldo Maldonado Júnior, for his relevant contributions to the biology and taxonomy of *Echinostoma*.

Description

Adult ($n = 24$, Figs 1 and 2; measurements in Table 1): Body slender, elongate, dorsoventrally flattened, with maximum width at uterine level, 4.5–6.4 times longer than wide, with almost parallel lateral margins and notable constriction at posterior margin of ventral sucker. Tegument with scale-like spines in alternating transverse rows, denser at pharynx region, extending to level of posterior margin of ventral sucker and reaching posterior testis level on ventral surface. Forebody short, 9–15% of body length. Head collar ($n = 10$) well developed, reniform, width representing 18–34% of maximum body width. Collar spines conspicuous, 37 in number in most specimens (5 with 37, 2 with 33, 1 with 36, 38 or 39 spines), with following arrangement: 5 angle spines (3 oral and 2 aboral); 6 lateral spines in single row on each ventral lappet, and 15 dorsal spines in double row (8 oral and 7 aboral). Dorsal spines varying in length, with the dorsolateral spines markedly larger than central (dorsalmost) spines. Oral sucker ventro-subterminal, rounded, muscular. Prepharynx very short; pharynx oval to elongate-oval, muscular. Oesophagus short, 2–4% of body length; oesophageal bifurcation just anterior to ventral sucker; intestinal caeca blind, almost reaching posterior extremity. Ventral sucker spherical, muscular, located in the first quarter of body; 2 times as large as oral sucker (suckers–width ratio 1:2.1–2.4). Testes 2, subglobular, smooth or slightly indented, in tandem, located in third quarter of body; post-testicular region (between posterior testis and posterior extremity) corresponding to 25–44% of body length. Cirrus sac elongate-oval, anterior to ventral sucker, with a simple elongate-oval seminal vesicle, well-developed pars prostatica, coiled ejaculatory duct and unspined cirrus. Genital pore at the level of anterior margin of ventral sucker. Ovary transversely oval, post-equatorial, pretesticular. Mehlis' gland contiguous with ovary. Uterus intercaecal, with numerous coils between ventral sucker and ovary; uterine field corresponding to 24–32% of body length. Metraterm short, weakly muscular. Vitellarium follicular, forming 2 lateral non-confluent fields of small follicles overlapping caeca and extending from level of the region slightly posterior to ventral sucker to posterior extremity of body. Eggs abundant, oval, yellow, operculated, immature.

Larval stages

Mature redia ($n = 23$, Fig. 3A; Table 2): Body elongate, tapered at its anterior and posterior ends, with yellowish pigment. Collar absent. Pharynx subspherical, muscular. Caecum short, with dark pigment inside. Birth pore prominent at the anterior region, lateral. Two prominent locomotor appendages present at about 2/3 of body length.

Cercaria ($n = 36$, Fig. 3B–D; Table 2): Body elongate-oval, with maximum width just anterior to ventral sucker. Tegument smooth. Collar well developed, with 37 spines, arranged as in adults. Oral sucker rounded, subterminal. Pharynx ovoid, muscular. Oesophagus long; oesophageal bifurcation just anterior to

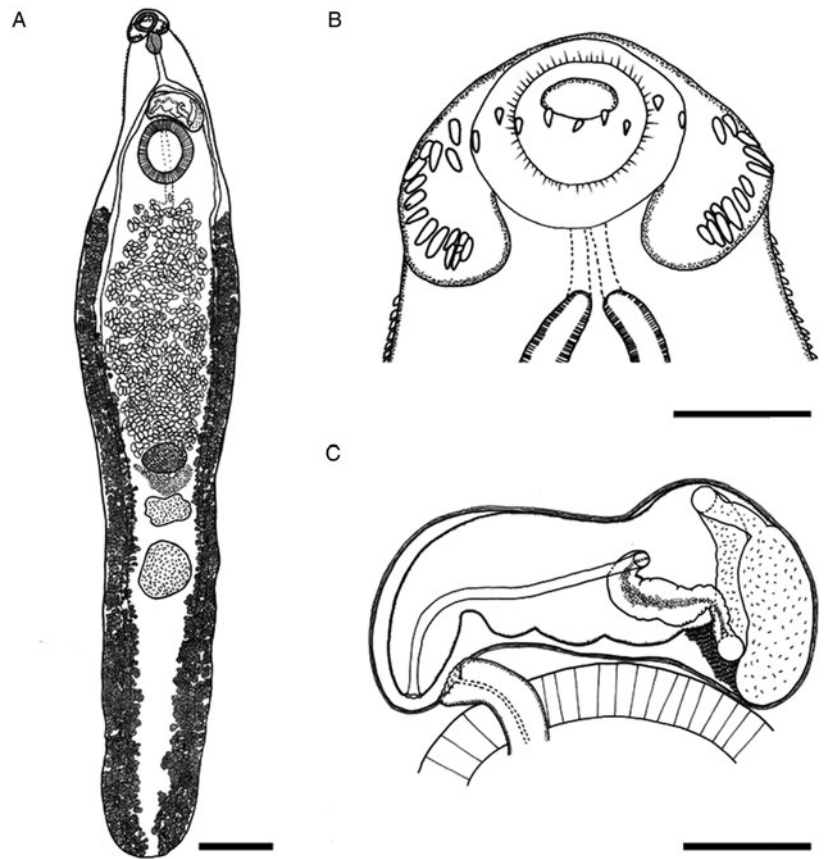


Fig. 1. *Echinostoma maldonadoi* n. sp. line drawings of the holotype. (A) Whole view. (B) Detail of cephalic collar. (C) Detail of genital complex. Scale bars: A: 1 mm; B, C: 250 μ m.

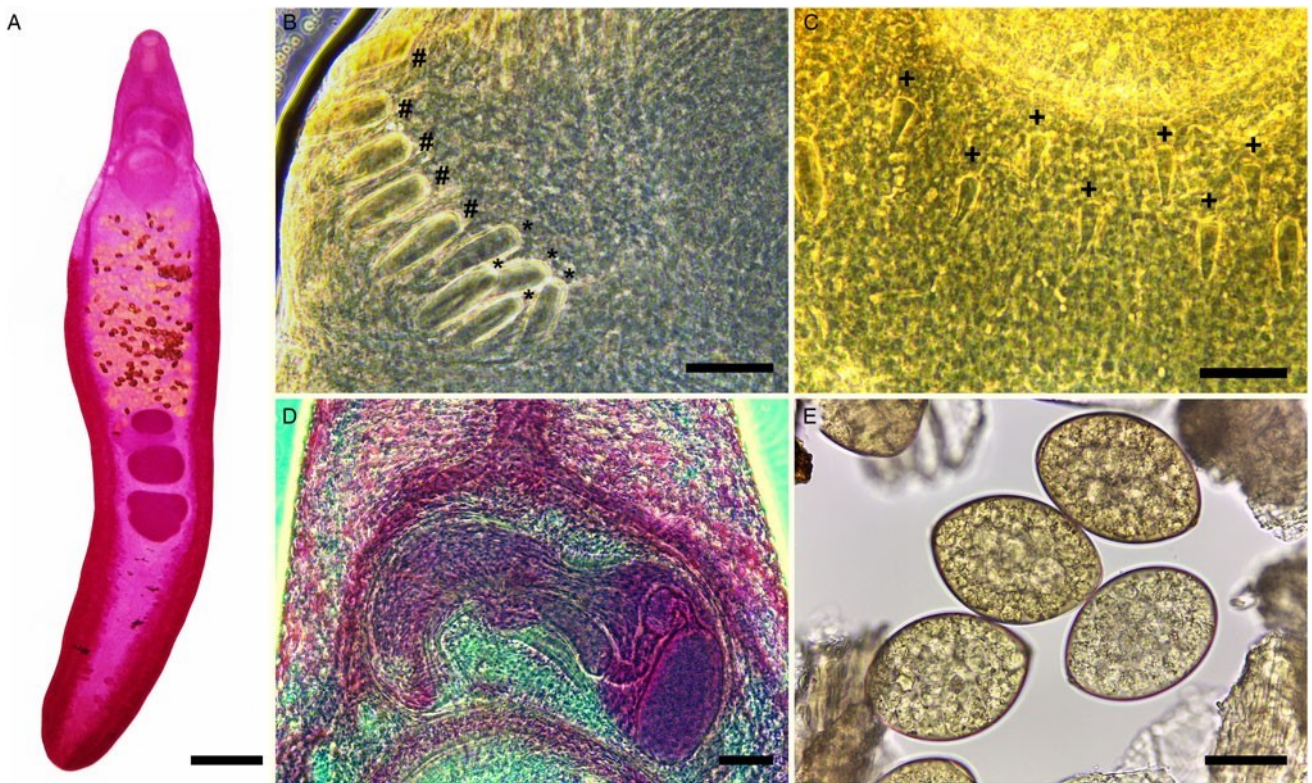


Fig. 2. Micrographs of *Echinostoma maldonadoi* n. sp. (A) Whole view of a carmine-stained paratype. (B) Detail of angular (*) and lateral (#) spines. (C) Detail of dorsal spines (+). (D) Detail of the cirrus sac. (E) Eggs obtained in feces. Scale bars: A: 1 mm; B, C, E: 50 μ m; D: 100 μ m.

ventral sucker. Caeca long, with granular content inside, extending up to posterior extremity. Ventral sucker subglobular, muscular, just post-equatorial, slightly larger than the oral sucker; average ratio between suckers width, 1:1.4 (1:1.0–1.6).

Penetration glands with granular content, preacetabular, medially distributed, along oesophagus, with canaliculi directed to anterior region, opening in 6 ducts at extremity of oral sucker (Fig. 3D). Parasophagean glands absent. Cystogeneus glands with

Table 1. Morphometric data for adults of *Echinostoma maldonadoi* n. sp. and isolates of *Echinostoma paraensei* and *Echinostoma pseudorobustum*

Hosts	<i>Echinostoma maldonadoi</i> n. sp.	<i>Echinostoma paraensei</i>		<i>Echinostoma pseudorobustum</i>	
	<i>Stenophysa marmorata</i> ^N ; <i>Meriones unguiculatus</i> ^E	<i>Biomphalaria glabrata</i> ^{N,E} ; <i>Physella acuta</i> ^E ; hamsters ^E , mice ^E , rats ^E	<i>Biomphalaria glabrata</i> ^E ; hamsters ^E	<i>Nectomys squamipes</i> ^N , <i>B. glabrata</i> ^E , hamsters ^E	<i>Gallus domesticus</i> ^N
Specimens and condition	n = 24, 15 dpi	n = 30, 12–109 dpi	BH isolate, n = 6, 28 dpi	RJ isolate, n = 30, 28 dpi	n = 2
References	This study	Lie and Basch (1967)	Maldonado <i>et al.</i> (2001a)		Valadão <i>et al.</i> (2022)
BL (mm)	10.8 ± 0.7 (9.1–12.2)	7.5–16.0	16.3 ± 159	15.5 ± 1.4	10.9–11.5
BW (mm)	2.0 ± 0.2 (1.8–2.4)	0.8–2.0	2.4 ± 80	2.4 ± 157	1.6–1.8
BW (%)	19 (15–22)	11.9*	–	13.4*	14.3–16.1
FORE (mm)	1.3 ± 0.2 (1.0–1.6)	1.6*	–	2.9*	2.1
FORE (%)	12 (9–16)	10.9*	–	13.7*	18.5–19.3
CL	291 ± 22 (250–339)	408–828	–	392*	255–309
CW	539 ± 43 (37–588)	276–660	545 ± 79	657 ± 96	801–855
CW/BW	27 (18–34)	37.4*	–	24.9*	45.8–53.2
Spines	37 (33–39)	37	36	35–37	37
AOSL	48 ± 6 (35–64)	36–99	77.7 ± 5.5	44.2 ± 5.8	39–77
AASL	48 ± 6 (31–60)	36–99	79.4 ± 9.4	45.5 ± 5.6	39–77
LSL	55 ± 6 (42–68)	36–99	74.1 ± 13.6	52.2 ± 5.1	36–107
DLSL	52 ± 6 (38–64)	22–33	56.9 ± 6.9	38.0 ± 8.1	30–84
DMSL	32 ± 8 (21–56)	22–33	–	37.5 ± 7.6	30–84
OL	330 ± 42 (273–400)	360–664	388 ± 54	405 ± 73	1.1
OL (%)	3 (2–4)	3.56*	–	1.54*	9.8–10
OSL	206 ± 18 (178–232)	347*	255 ± 28	338 ± 50	200–255
OSW	312 ± 24 (273–364)	216–408	274 ± 33	384 ± 60	309–346
VSL	780 ± 34 (728–837)	695*	870 ± 38	824 ± 65	746–765
VSW	765 ± 21 (728–801)	456–1008	917 ± 75	930 ± 108	801–837
OSW/VSW	1:2.5 (1:2.1–2.4)	1:2.8	–	1:1.4	1:2.3–2.7
PL	41 ± 12 (18–53)	72–120	139 ± 26	129 ± 42	87–123
PHL	289 ± 32 (182–346)	180–348	198 ± 26	287 ± 57	182
PHW	190 ± 20 (160–214)	180–288	161 ± 16	231 ± 42	182
ATL	597 ± 118 (255–765)	384–732	752 ± 179	844 ± 132	528–710
ATW	740 ± 78 (491–910)	312–612	717 ± 108	763 ± 95	492–583
PTL	772 ± 91 (491–892)	408–852	917 ± 99	940 ± 110	564–765
PTW	726 ± 58 (582–856)	312–516	741 ± 113	750 ± 83	473–710
TEND (mm)	4 ± 1 (3–5)	5.39*	–	5.7*	2.0–2.3
TEND (%)	34 (25–44)	35.7*	–	27.1*	18.4–19.8
OVL	384 ± 32 (328–437)	279*	490 ± 39	476 ± 86	273–364
OVW	556 ± 59 (400–655)	250–408	682 ± 51	712 ± 54	328–492
OVAR (mm)	3 ± 1 (2–4)	4.8*	–	7.2*	4.5–4.8
OVAR (%)	28 (24–32)	31.8*	–	34.4*	38.8–44.4
Eggs (L)	112 ± 4 (105–120)	104–122	–	120 ± 5	92–135
Eggs (W)	79 ± 3 (72–84)	74–86	–	85 ± 4	42–71

^N = natural hosts; ^E = experimental host; * = estimated from the published drawing; – = data unavailable. Measurements are in micrometres, unless otherwise stated.

rhabditiform content located laterally through body. Genital primordia composed by 2 masses of cells dorsal to ventral sucker. Tail long, larger than body, average ratio between body and tail length 1:1.4 (1:0.9–1.7); ending in a highly contractile

finger-like process, slender, presenting tegumental fin-folds. Number and disposition of tail fin-folds not observed. Excretory vesicle

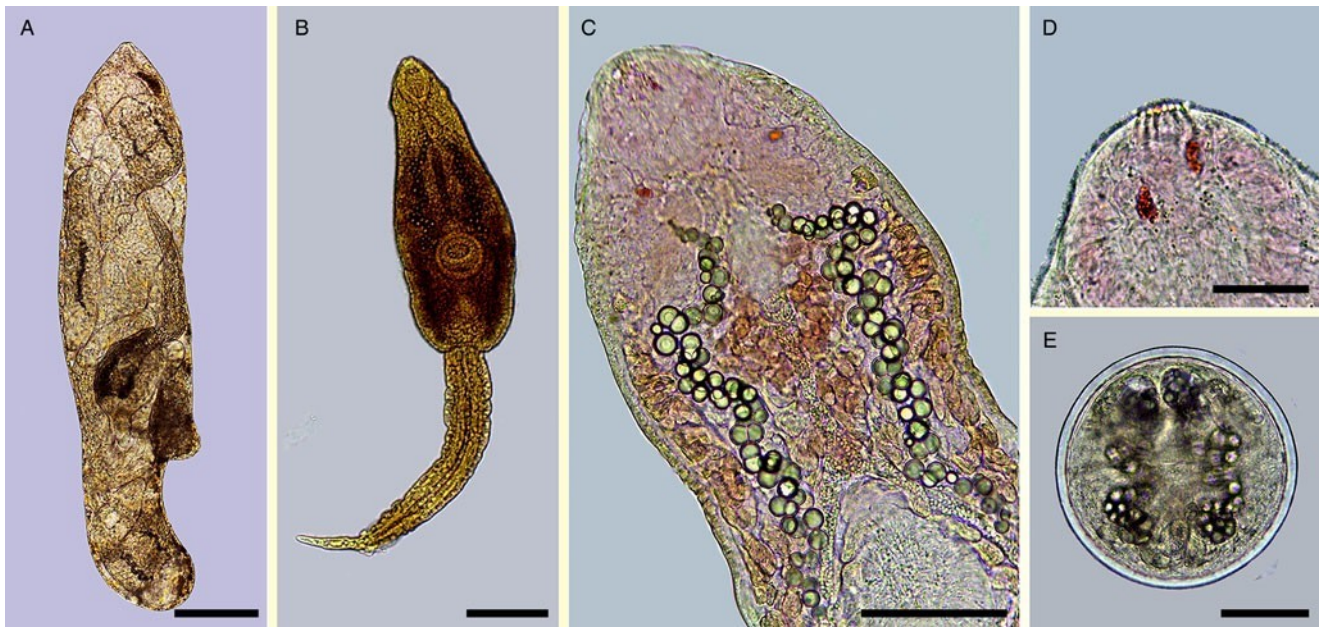


Fig. 3. *Echinostoma maldonadoi* n. sp. larval stages found in *Stenophysa marmorata* from Brazil. (A) Redia. (B) Cercaria. (C) Detail of the body of cercaria. (D) Detail of anterior end. (E) Metacercaria. Scale bars: A: 200 μ m; B: 100 μ m; C, E: 50 μ m; D: 20 μ m.

Table 2. Morphometric data of larval developmental stages of *Echinostoma maldonadoi* n. sp. and *Echinostoma paraensei* from Brazil

	<i>Echinostoma maldonadoi</i> n. sp.		<i>Echinostoma paraensei</i>
		<i>Stenophysa marmorata</i> ^N	<i>Biomphalaria glabrata</i> ^{NE} ; <i>B. straminea</i> ^E ; <i>Physella acuta</i> ^E
Hosts			
References		This study	Lie and Basch (1967)
Cercaria			
Body	L	267 ± 20 (218–310)	228–275
	W	92 ± 10 (73–109)	117–136
Oral sucker	L	37 ± 4 (28–50)	41.7*
	W	36 ± 2. (28–42)	35–40
Pharynx	L	19 ± 2 (18–27)	16–25
	W	18 ± 1 (16–18)	17–22
Ventral sucker	L	49 ± 6 (35–57)	41–51
	W	50 ± 5 (35–57)	41–51
Oral sucker/ventral sucker		1.4 (1:1.0–1.6)	1:1.4*
Tail	L	397 ± 37 (345–455)	412–490
	W	36	41–47
Tail/body		1.4 (1:0.9–1.7)	1:1.4*
Redia			
Body	L	988 ± 405 (363–2209)	425–1600
	W	190 ± 58 (76–271)	118–450
Pharynx	L	42 ± 13 (24–75)	–
	W	41 ± 15 (21–74)	25–105
Locomotory appendages	L	337 ± 196 (160–908)	138–950
Metacercaria			
Whole cyst	D	135 ± 7 (116–145)	132–148
Cystic wall	L	6 ± 3 (3–11)	5

^N = natural hosts; ^E = experimental host; L, length; W, width; D, diameter; %, proportion; * = estimated from the published drawing. Measurements are expressed in micrometres.

small, at posterior extremity of body. Main ducts of excretory system presenting numerous, small calcareous concretions (about 50, 6–9 μm of diameter) between the pharynx and ventral sucker. Details of excretory system, including flame-cell formula, position of excretory pore and caudal excretory duct not characterized.

Metacercaria ($n = 35$, Fig. 3E; Table 2): cysts spherical, on average $135 \pm 7 \mu\text{m}$ in diameter; cyst walls composed of 2 layers, the outer layer transparent, about 6 μm thick, and the inner layer opaque, thin, about 2 μm thick.

Remarks

The experimentally recovered adult specimens can be readily distinguished from all but 1 species of *Echinostoma* of the 'revolutum' complex by bearing tiny dorsal collar spines, much smaller than the dorsolateral and lateral ones (see description). Despite the differences in the head collar commented above, the recently described *E. pseudorobustum* Valadão *et al.*, 2022 presents similar size and body shape. However, this species is differentiated by having a longer forebody (FORE% *c.* 18.9 vs 12), oesophagus length as a proportion of body length (OSL% *c.* 10 vs 3), head collar as a proportion of body width (CW/BW *c.* 49.5 vs 26.1%) and uterine field (OVAR *c.* 41.6 vs 28%).

Taking into account the morphological data alone, we initially assigned the new taxon to *E. paraensei* because this species is the only one in the 'revolutum' complex that also possesses tiny dorsal collar spines (Kostadinova and Gibson, 2000), and also due to similar morphometrics comparing other key morphological features (see Table 1). The geographical origin of the specimens studied (Mesoregion of Belo Horizonte) also led us to preliminarily identify the isolate as *E. paraensei*. There are some differences observed between the newly collected specimens and those previously identified as *E. paraensei* by other workers, e.g. body shape (BW%, 19 vs 12–13), ratio between the width of oral and ventral suckers (OSW:VSW, 1:2.5 vs 1:1.4–2.8) and prepharynx length (PL) (PL: 41 vs 72–120 μm in the original description). These differences are attributed here to the evaluation of specimens with different ages (range of 12–109 dpi) in each study as individuals continue to grow after reaching maturity and the use of different techniques for fixing the material (flattening or not of the specimens).

While morphological features suggested the conspecificity of *E. maldonadoi* n. sp. and *E. paraensei*, molecular data, specifically based on the mitochondrial nad1 gene, revealed interspecific levels of nucleotide divergence between the 2 species (see below).

Molecular study

Partial sequences of the 28S rRNA gene (1197 bp), ITS1-5.8S-ITS-2 region (1159 bp), *cox1* gene (415 bp) and nad1 gene (478 bp) were successfully generated for the isolate of 37-collar-spined *E. maldonadoi* n. sp. Phylogenetic trees were reconstructed using BI and ML criteria, but only those obtained through the first approach are shown, including values of nodal support for both analyses. The trimmed 28S alignment was 1051 bp long and included 18 sequences for 14 species of the 'revolutum' group of *Echinostoma*. The phylogenetic reconstruction based on this gene (Fig. 4A) revealed that *E. maldonadoi* n. sp. clustered in a well-supported clade with an isolate of *E. paraensei* maintained under laboratory conditions in the USA, without nucleotide differences between the sequences. The interspecific variation in relation to other *Echinostoma* spp. included in the analyses was 0.3–1.1%.

A dataset containing 9 species of *Echinostoma* was included in the analysis of the nuclear region ITS1-5.8S-ITS2 (trimmed alignment: 1001 bp). *Echinostoma maldonadoi* n. sp. grouped with 3 Brazilian isolates of *E. paraensei* in a strongly supported clade

(97/0.98) (Fig. 4B), but the actual phylogenetic affinities with these isolates remained unclear. Moreover, the molecular divergence in relation to the 4 isolates of *E. paraensei* from *N. squamipes* was low (0–0.1%). Representatives of this clade appeared as sister to isolates of *E. trivolvis*, but the support was low. The interspecific genetic variation in relation to other *Echinostoma* spp. included in the analyses was 0.7–2.6%.

The molecular data obtained for the faster evolving mitochondrial genes (*nad1* and *cox1*) revealed nucleotide differences between the new species and *E. paraensei*. For *cox1* gene, a trimmed alignment (366 bp) containing 8 species of *Echinostoma* was analysed. The resolution of the tree was poor resulting in a polytomy, which hampered our understanding on the phylogenetic relationships of most taxa (Fig. 5A). Nevertheless, *E. maldonadoi* n. sp. was recovered in a strongly supported clade together with *E. paraensei*. Moreover, in the *cox1* tree, *E. maldonadoi* n. sp. + *E. paraensei* is a sister group to *E. caproni*, and this nesting was well-supported by BI (0.96). This clade forms a polytomy with *E. cinetorchis*, *E. miyagawai* and 2 '*E. revolutum*' isolates. The genetic divergence between *E. maldonadoi* n. sp. and the laboratory isolate of *E. paraensei* from the USA was 3.8% (difference at 14 nucleotide positions), which might suggest that they do not belong to the same species. The molecular divergence in relation to other *Echinostoma* spp. ranged from 10.9 to 15.9%.

The molecular analysis based on the *nad1* gene unequivocally confirmed the distinct species status of *E. maldonadoi* n. sp. The trimmed alignment (438 bp) included 153 sequences of 19 species/species-level lineages of *Echinostoma*. In the well-resolved phylogenetic tree (Fig. 5B), the new species grouped in a strongly supported clade with 3 isolates of *E. paraensei*, and both appeared as sister clade to *E. nasincovae* (albeit with no support in the ML analysis). The genetic divergence in relation to the isolate of *E. paraensei* maintained under laboratory conditions in the USA, and in relation to another isolate of the same species from Brazil, reported by Morgan and Blair (1998b), was 6.2% (for 2 isolates) and 6.4% (27 and 28 nucleotides), respectively, which fell into the interspecific range of variability for *Echinostoma* spp. of the 'revolutum' group. Moreover, the newly described species exhibited a genetic divergence of 12.3–21.0% compared with the other species of the 'revolutum' group. *Echinostoma maldonadoi* n. sp. can be diagnosed based on unique sites/nucleotides in specific positions of the *nad1* alignment comparing to isolates of *E. paraensei*: 11–A, 20–C, 36–A, 37–T, 47–A, 68–G, 71–C, 81–T, 107–C, 119–A, 122–T, 144–A, 188–G, 197–T, 245–A, 260–T, 275–A, 314–T, 321–A, 337–C, 351–C, 365–T, 372–G, 398–G, 402–C, 405–G, 410–T (see Supplementary file – Alignment of sequences *nad1* from these isolates).

Discussion

Our understanding of the species diversity of the genus *Echinostoma* has been improved by integrating molecular and morphological approaches to better delimit species boundaries and consequently address more accurately questions concerning host use, geographical distribution and life cycle (Georgieva *et al.*, 2013, 2014; Faltýnková *et al.*, 2015; Izrailskaia *et al.*, 2021; Valadão *et al.*, 2022). A number of studies stressed the presence of several cryptic lineages within the 'revolutum' species complex of *Echinostoma*, mostly from the Holarctic realm (Detwiler *et al.*, 2010, 2012; Georgieva *et al.*, 2014; Izrailskaia *et al.*, 2021), which presented challenges either for identification of known taxa or the proposal of new taxa with no morphological differential trait to report. Even though cryptic diversity is more common among trematodes than other groups of parasitic helminths (Pérez-Ponce de León and Poulin, 2018), some of the cryptic evolutionary

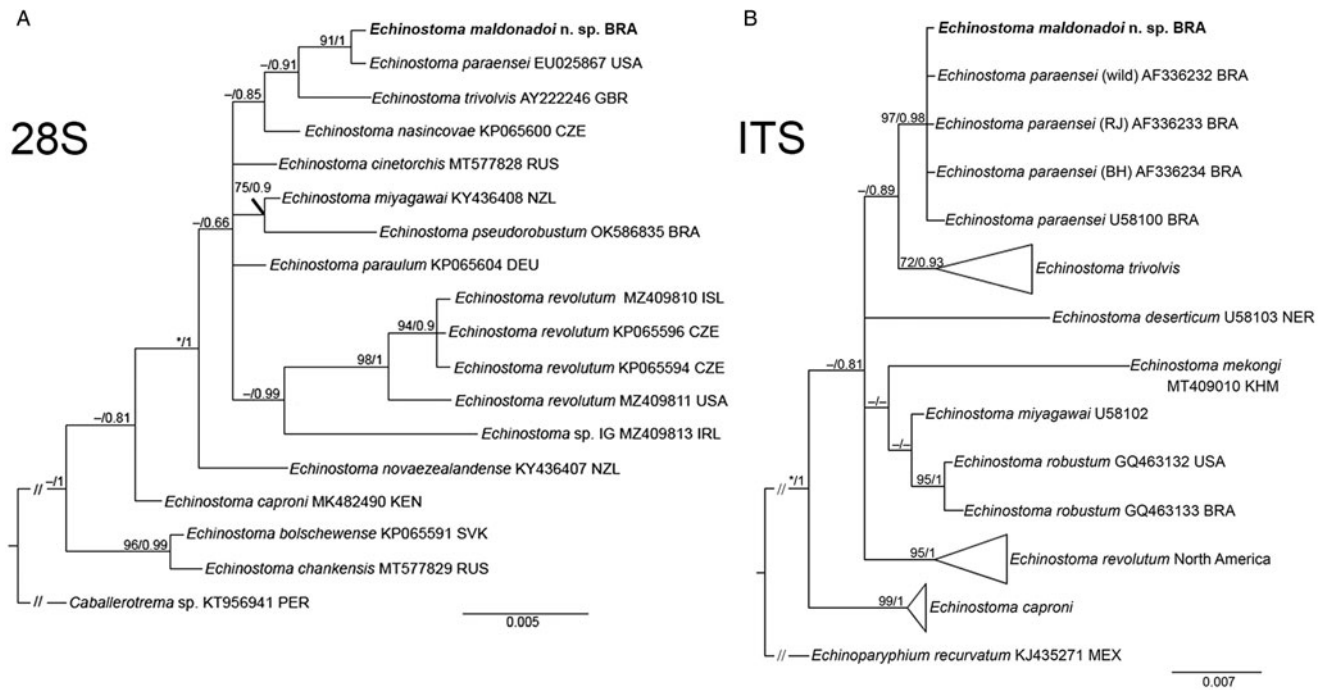


Fig. 4. Phylogenetic relationship between *Echinostoma maldonadoi* n. sp. (in bold) and other 37-collar-spined *Echinostoma* species inferred from sequences of 28S rDNA (1051 bp; nucleotide substitution model: HKY + G) (A) and of internal transcribed spacer (ITS) (1001 bp; nucleotide substitution model: K2 + G) (B) based on maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) analyses. Nodal support is indicated as ML/BI; values <0.70 (BI) and <70 (ML) are indicated by a dash.

independent lineages found in previous studies of *Echinostoma* spp. may be found morphologically identifiable, once all developmental stages (primarily adults) are described. In the present study, the integration of morphological, molecular and life cycle data made it possible to propose a new species of *Echinostoma*, *E. maldonadoi* n. sp., cryptically related to *E. paraensei* considering all developmental stages, yet some morphometric differences were found between isolates of the new species and *E. paraensei* (see remarks).

From the biological point of view, the intermediate host use is not considered a significant difference between *E. paraensei* and *E. maldonadoi* n. sp. Although natural infection for the former was reported in planorbid snails, *B. grabrata* and *Glyptophysa* sp., in Brazil and Australia, respectively (Lie and Basch, 1967; Morgan and Blair, 1998a), the experimental susceptibility of physid snails to *E. paraensei* was reported to the isolate from Belo Horizonte (original description) (Lie and Basch, 1967) and for the isolate from Sumidouro, state of Rio de Janeiro, Brazil (Maldonado *et al.*, 2001b). Nevertheless, echinostome cercariae were not found among 767 specimens of *Biomphalaria* spp. (including *B. glabrata*) collected in Alvorada de Minas (Coelho *et al.*, 2021), the type locality of *E. maldonadoi* n. sp., which may suggest that *E. paraensei* and *E. maldonadoi* n. sp. are primarily found in planorbid and physid snails, respectively, at least in natural conditions.

A question that emerges from this study, but that is impossible to be answered at the current stage of the knowledge, is whether the subsequent reports of *E. paraensei*-like specimens really correspond to this taxon or *E. maldonadoi* n. sp., or even to another new cryptic species of the genus. Interestingly, some relevant differences between isolates identified as *E. paraensei* were reported regarding: the time of miracidial development, worm burden, number of uterine eggs and parasite distribution in the site of infection (Maldonado *et al.*, 2001a, 2001b, 2005). The possibility that such differences may represent interspecific variation instead of just evident phenotypic plasticity, as previously thought

(Maldonado *et al.*, 2005), cannot be ruled out. In this sense, future *nad1* sequencing of this laboratory-maintained isolate of *E. paraensei* is here encouraged for taxonomic validation of the parasite species used in the different experimental studies previously published (Ferraz *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.*, 2013; Monte *et al.*, 2016, 2018, 2019; Souza *et al.*, 2017b).

The utility of the most densely sampled nuclear ribosomal genetic regions, 28S and ITS, and mitochondrial protein-coding genes, *cox1* and *nad1*, were evaluated in molecular phylogenetic studies (Morgan and Blair, 1998a, 1998b; Georgieva *et al.*, 2014; Izrilskaia *et al.*, 2021). While all of them agree that mitochondrial genes should be the first choice for barcoding species of *Echinostoma* in the 'revolutum' group, as nuclear ribosomal genes may not provide enough phylogenetic signal to differentiate closely related species, they differ concerning which mitochondrial marker is more informative. Most of the scientific contributions provided compelling evidence that *nad1* shows a sufficient gap between levels of intraspecific and interspecific genetic divergence, the so-called barcode gap, allowing the identification of species boundaries (Morgan and Blair, 1998b; Georgieva *et al.*, 2014, 2017). For this reason, most taxonomic surveys on *Echinostoma* provided *nad1* sequences (Georgieva *et al.*, 2014, 2017; Faltýnková *et al.*, 2015; Pantoja *et al.*, 2021). However, Izrilskaia *et al.* (2021) argued that *cox1* may be more informative than *nad1* and might solve more confidently taxonomic problems within the Echinostomatidae.

In the present study, we reinforce the limitations of ribosomal nuclear DNA for the distinction of closely related species (the new taxon could not be recognized using this dataset) and found only moderate nucleotide divergence (3.83%) using *cox1* between the sister taxa *E. maldonadoi* n. sp. and *E. paraensei*, much lower than the 6.3–13.7% and 7.3–16.8% interspecific values reported by Morgan and Blair (1998b) and Izrilskaia *et al.* (2021), respectively. These different values may just be biased by the paucity of *cox1* sequences for *Echinostoma* spp., leaving just a few sequences of closely related sister taxa to be compared. Contrary to that, the

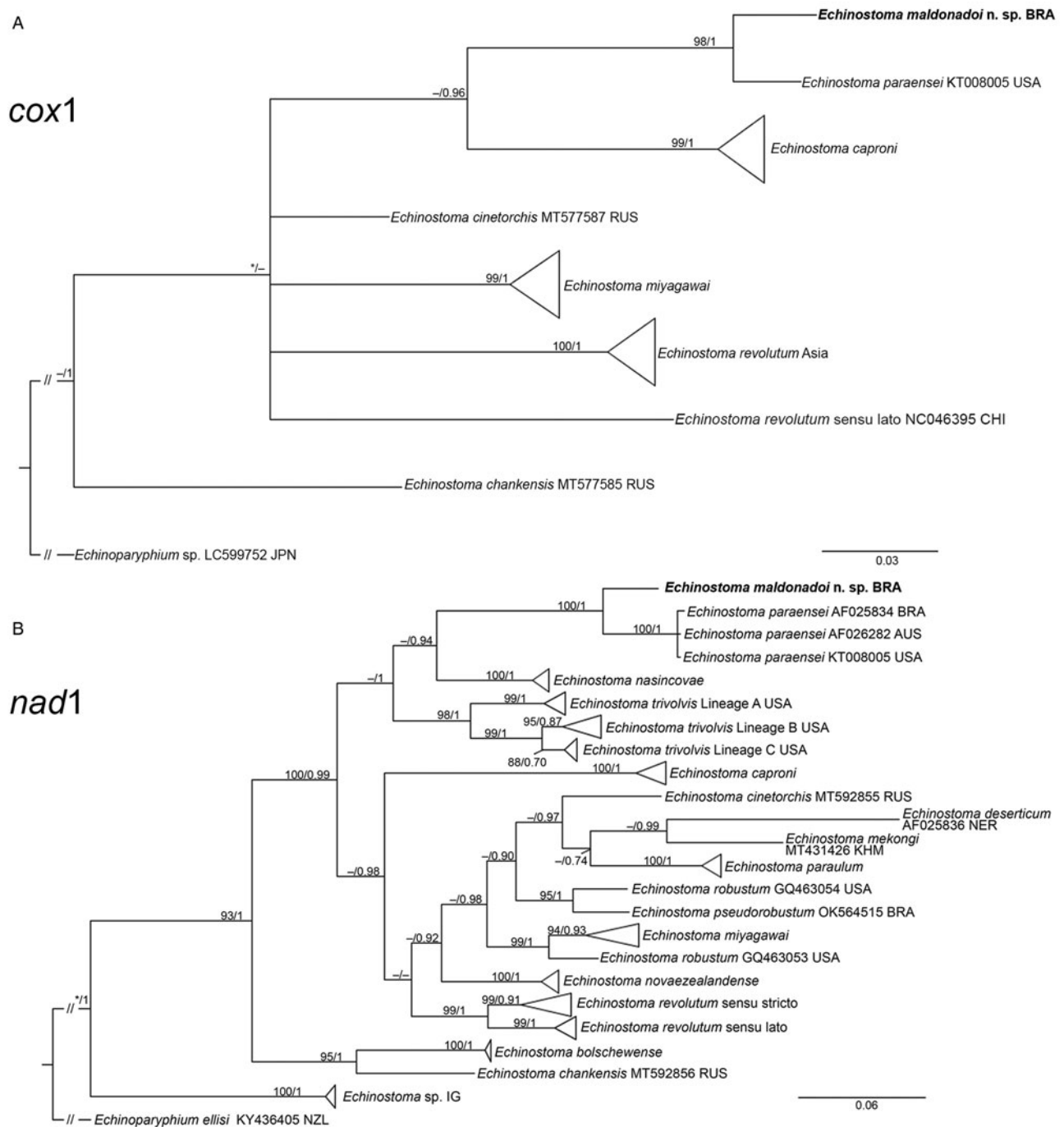


Fig. 5. Phylogenetic relationship between *Echinostoma maldonadoi* n. sp. (in bold) and other 37-collar-spined *Echinostoma* species inferred from sequences of *cox1* mtDNA (366 bp; nucleotide substitution model: HKY + I) (A) and of *nad1* (438 bp; nucleotide substitution model: HKY + G + I) (B) based on maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) analyses. Nodal support is indicated as ML/BI; values <0.70 (BI) and <70 (ML) are indicated by a dash.

divergence values (6.2–6.4%) of the *nad1* marker between the new species and *E. paraensei* were within the interspecific range of variability for *Echinostoma* spp. of the ‘*revolutum*’ group. For instance, in the most comprehensive study involving molecular taxonomy and species delineation in *Echinostoma* spp., Georgieva *et al.* (2014) recognized 17 species/species-level lineages using *nad1* dataset and found 4.2–21.5% of interspecific divergence. Moreover, identification was achieved for all mono-phyletic lineages at 3% divergence threshold. These same authors found a mean intraspecific divergence of 0.2–1.8%. More recently, Pantoja *et al.* (2021) reported 0–1.6% of intraspecific divergence for *Echinostoma revolutum* s.str. from Europe and 0.5–1.2% for isolates identified as *Echinostoma* sp. IG. Thus, the divergence

found between *E. maldonadoi* n. sp. and *E. paraensei* is more than double from the higher intraspecific divergence previously reported for species of *Echinostoma*. It is also worth noting, that the nucleotide divergence using *nad1* between *E. maldonadoi* n. sp. and the remaining species of the ‘*revolutum*’ group (12.3– 21.0%) was considerably higher than compared with its sister taxon (*E. paraensei*), which may indicate a very recent speciation event and segregation into these 2 morphologically indistinguishable species.

Our findings support the conclusions of Morgan and Blair (1998b) and Georgieva *et al.* (2014) that the best mitochondrial marker for the investigation of phylogenetic interrelationships and identification of cryptic diversity within the ‘*revolutum*’

group of *Echinostoma* is nad1. In fact, most internal or terminal clades are strongly supported in our phylogenetic reconstruction. Moreover, the availability of nad1 datasets with larger taxonomic and geographical coverage in relation to the remaining markers allows the comparison of genetic distances between 2 putative species with values available for 'benchmark' congeners. Nevertheless, finding a 'genetic yardstick' remains challenging in trematodes (Nadler and Pérez-Ponce de León, 2011) and even in *Echinostoma*.

Even though the reciprocal monophyly of *E. maldonadoi* n. sp. and *E. paraensei* could not be assessed as only a single haplotype of the new taxon was herein detected, the knowledge leveraged for the molecular taxonomy of this genus in the last 2 decades, including a clear barcode gap using nad1 dataset, suffices for our new species proposal. This hypothesis though may be strengthened by molecular characterization of new isolates and widening the number of target molecular markers, such as encompassing the entire mitochondrial genome.

Supplementary material. The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S003118202300001X>

Author's contributions. M. C. V., P. V. A. and H. A. P. conceived and designed the study. P. R. S. C. and S. M. G. conducted fieldwork. H. A. P. and J. C. A. A. performed the experimental infection work. M. C. V., D. L.-H. and P. V. A. performed molecular and phylogenetic analyses. M. C. V., J. C. A. A. and H. A. P. performed the morphological work. M. C. V., P. V. A., D. L.-H., J. C. A. A., P. R. S. C., S. M. G. and H. A. P. wrote the manuscript. H. A. P. also contributed to supervising, reviewing and editing of the manuscript.

Financial support. This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil (research scholarship to H. A. P.) and the National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES), Brazil (student scholarship to M. C. V., D. L. H., P. R. S. C. and post-doctoral scholarship to P. V. A.). P. V. A. was partially supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP; grant 2021/12593-2).

Conflict of interest. None.

Ethical standards. The procedures related to the experimental infection and euthanasia were according to the recommendations for the care and use of laboratory animals, and was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA UFMG protocol #20/2016).

References

- Adema CM, Léonard PM, DeJong RJ, Day HL, Edwards DJ, Burgett G, Hertel LA and Loker ES (2000) Analysis of messages expressed by *Echinostoma paraensei* miracidia and sporocysts, obtained by randomEST sequencing. *Journal of Parasitology* 86, 60–65.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410.
- Chai JY, Cho J, Chang T, Jung BK and Sohn WM (2020) Taxonomy of *Echinostoma revolutum* and 37-collar-spined *Echinostoma* spp.: a historical review. *Korean Journal of Parasitology* 58, 343–371.
- Chai JY, Jung BK, Chang T, Shin H, Cho J, Ryu JY, Kim HS, Park K, Jeong MH, Hoang EH and Abullah MBM (2021) *Echinostoma miyagawai* Ishii, 1932 (Echinostomatidae) from ducks in Aceh Province, Indonesia with special reference to its synonym with *Echinostoma robustum* Yamaguti, 1935. *Korean Journal of Parasitology* 59, 35–45.
- Coeelho PRS, Ker FTO, Araújo AD, Guimarães RJPS, Negrão-Corrêa DA, Caldeira RL and Geiger SM (2021) Identification of risk areas for intestinal schistosomiasis, based on malacological and environmental data and on reported human cases. *Frontiers in Medicine* 8, 642348.
- Coeelho PRS, Ker FTO, Araújo AD, Pinto HA, Negrão-Corrêa DA, Caldeira RL and Geiger SM (2022) Ecological aspects and survey of limnic gastropods: relationships between human health and conservation. *Pathogens* 11, 1533.
- Combes C (1982) Trematodes: antagonism between species and sterilizing effects on snails in biological control. *Parasitology* 84, 151–175.
- Detwiler JT, Bos DH and Minchella DJ (2010) Revealing the secret lives of cryptic species: examining the phylogenetic relationships of echinostome parasites in North America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55, 611–620.
- Detwiler JT, Zajac AM, Minchella DJ and Belden LK (2012) Revealing cryptic parasite diversity in a definitive host: echinostomes in muskrats. *Journal of Parasitology* 98, 1148–1155.
- Faltýnková A, Georgieva S, Soldánová M and Kostadinova A (2015) Assessment of species diversity within the 'revolutum' group of *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) in Europe. *Systematic Parasitology* 90, 1–25.
- Fernandes BMM, Justo MCN, Cárdenas MQ and Cohen SC (2015) *South American Trematodes Parasites of Birds and Mammals*. Rio de Janeiro: Oficina de Livros.
- Ferraz J, Souza J, Costa-Silva M, Torres E, Santana A, Lanfredi R, Maldonado Jr A and Garcia J (2012) Effect of praziquantel on adult *Echinostoma paraensei* worms in experimentally infected mice. *Parasitology Research* 111, 143–148.
- Fried B and Graczyk TK (2000) *Echinostomes as Experimental Models for Biological Research*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Fried B and Peoples RC (2009) Maintenance, cultivation, and excystation of echinostomes: 2000–2007. In Fried B and Toledo R (eds), *The Biology of Echinostomes: From the Molecule to the Community*. New York: Springer Science + Business Media, pp. 111–128.
- Fried B, Kanev I and Reddy A (2009) Studies on collar spines of echinostomatid trematodes. *Parasitology Research* 105, 605–608.
- Fujino T, Nakano T, Washioka H, Tonosaki A, Ichikawa H and Fried B (2000) Comparative ultrastructure of eggs in *Echinostoma paraensei*, *E. caproni* and *E. trivolvis* (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitology Research* 86, 427–430.
- Garcia JS, Maldonado Jr A, Bidau CJ, Corrêa LR, Lanfredi RM and Coelho PMZ (2010) The effect of early infection with *Echinostoma paraensei* on the interaction of *Schistosoma mansoni* with *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 499–503.
- Garcia JS, Hooper CS, Simões RO, Santos MAJ, Maldonado Jr A and Silva JP (2011). Biochemical and histological responses of *Rattus norvegicus* (Wistar) infected with *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *Veterinary Parasitology* 178, 86–92.
- Garcia JS, Simões RO, Mota E, Santos IS and Maldonado Jr A (2021) Pathological effects of *Echinostoma paraensei* infection associated with pyogenic abscesses caused by *Pseudomonas aeruginosa* in Swiss mice. *Revista de Patologia Tropical* 50, 40–48.
- Georgieva S, Selbach C, Faltýnková A, Soldánová M, Sures B, Skirnisson K and Kostadinova A (2013) New cryptic species of the 'revolutum' group of *Echinostoma* (Digenea: Echinostomatidae) revealed by molecular and morphological data. *Parasites & Vectors* 6, 64.
- Georgieva S, Faltýnková A, Brown R, Blasco-Costa I, Soldánová M, Sitko J, Scholz T and Kostadinova A (2014) *Echinostoma 'revolutum'* (Digenea: Echinostomatidae) species complex revisited: species delimitation based on novel molecular and morphological data gathered in Europe. *Parasites & Vectors* 7, 520.
- Georgieva S, Blasco-Costa I and Kostadinova A (2017) Molecular characterization of four echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) from birds in New Zealand, with descriptions of *Echinostoma novaezealandense* n. sp. and *Echinoparyphium poulini* n. sp. *Systematic Parasitology* 94, 477–497.
- Gonçalves JP, Oliveira-Menezes A, Maldonado Jr A, Carvalho TM and Souza W (2013) Evaluation of praziquantel effects on *Echinostoma paraensei* ultrastructure. *Veterinary Parasitology* 194, 16–25.
- Hanington PC, Lun CM, Adema CM and Loker ES (2010) Time series analysis of the transcriptional responses of *Biomphalaria glabrata* throughout the course of intramolluscan development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. *International Journal for Parasitology* 40, 819–831.
- Izraïlskaia AV, Besprozvannykh VV and Tatonova YV (2021) *Echinostoma chankensis* nom. nov., other *Echinostoma* spp. and *Isthmiophora hortensis* in East Asia: morphology, molecular data and phylogeny within Echinostomatidae. *Parasitology* 148, 1366–1382.
- Kostadinova A (2005) Family Echinostomatidae Looss, 1899. In Jones A, Gibson DI and Bray R (eds), *Keys to the Trematoda*, vol. 2. London, UK: CABI Publishing and The Natural History Museum, pp. 9–64.

- Kostadinova A and Gibson DI** (2000) The systematics of the echinostomes. In Fried B and Graczyk TK (eds), *Echinostomes as Experimental Models for Biological Research*. Dordrecht: Kluwer, pp. 31–57.
- Kostadinova A, Herniou EA, Barret J and Littlewood DTJ** (2003) Phylogenetic relationships of *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) and related genera re-assessed via DNA and morphological analyses. *Systematic Parasitology* 54, 159–176.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K** (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35, 1547–1549.
- Lie KJ and Basch PF** (1966) Life history of *Echinostoma barbosai* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). *Journal of Parasitology* 52, 1052–1057.
- Lie KJ and Basch PF** (1967) The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). *Journal of Parasitology* 53, 1192–1199.
- Loker ES, Cimino DF, Stryker GA and Hertel LA** (1987) The effect of size of M-line *Biomphalaria glabrata* on the course of development of *Echinostoma paraensei*. *Journal of Parasitology* 73, 1090–1098.
- Loker ES, Cimino DF and Hertel LA** (1992) Excretory-secretory products of *Echinostoma paraensei* mediate interference with *Biomphalaria glabrata* hemocyte functions. *Journal of Parasitology* 78, 104–115.
- Lunaschi LI, Drago FB and Nunez V** (2018) Two new species of *Echinostoma* (Digenea: Echinostomatidae) from Argentinean birds. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 89, 356–364.
- Luton K, Walker D and Blair D** (1992) Comparison of ribosomal internal transcribed spacer from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology* 56, 323–328.
- Lutz A** (1919) O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose, segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 11, 121–155.
- Maldonado Jr A, Loker ES, Morgan JAT, Rey L and Lanfredi RM** (2001a) Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. *Parasitology Research* 87, 840–848.
- Maldonado Jr A, Vieira GO, Garcia JS, Rey L and Lanfredi RM** (2001b) Biological aspects of a new isolate of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae): susceptibility of sympatric snails and the natural vertebrate host. *Parasitology Research* 87, 853–859.
- Maldonado Jr A, Vieira GO and Lanfredi RM** (2003) *Echinostoma luisreyi* n. sp. (Platyhelminthes: Digenea) by light and scanning electron microscopy. *Journal of Parasitology* 89, 800–808.
- Maldonado Jr A, Zeitone BK, Amado LA, Rosa IF, Machado-Silva JR and Lanfredi RM** (2005) Biological variation between two Brazilian geographical isolates of *Echinostoma paraensei*. *Journal of Helminthology* 79, 345–351.
- Marcilla A** (2009) Echinostomes: genomics and proteomics. In Fried B and Toledo R (eds), *The Biology of Echinostomes: From the Molecule to the Community*. New York: Springer Science + Business Media, pp. 130–141.
- Miura O, Kuris AM, Torchin ME, Hechinger RF, Dunham EJ and Chiba S** (2005) Molecular-genetic analyses reveal cryptic species of trematodes in the intertidal gastropod, *Batillaria cumingi* (Crosse). *International Journal for Parasitology* 35, 793–780.
- Monte TCC, Garcia JS, Gentile R, Vasconcellos MC, Souza J, Braga BV and Maldonado Jr A** (2016) In vivo and in vitro effects of the herbicide Roundup (®) on developmental stages of the trematode *Echinostoma paraensei*. *Experimental Parasitology* 169, 43–50.
- Monte TCC, Braga BV, Vasconcellos MC, Jurberg AD, Mota EM, Barbosa HS, Garcia JS and Maldonado Jr A** (2018) Morphological effects on helminth parasites caused by herbicide under experimental conditions. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 27, 42–51.
- Monte TCC, Chometon TQ, Bertho AL, Moura VS, Vasconcellos MC, Garcia J, Ferraz-Nogueira R, Maldonado Jr A and Faro MJ** (2019) Changes in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* infected with *Echinostoma paraensei* and exposed to glyphosate-based herbicide. *Journal of Invertebrate Pathology* 160, 67–75.
- Morgan JAT and Blair D** (1998a) Mitochondrial ND1 gene sequences used to identify echinostome isolates from Australia and New Zealand. *International Journal for Parasitology* 28, 493–502.
- Morgan JAT and Blair D** (1998b) Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacers and mitochondrial CO1 and ND1 genes for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda). *Parasitology* 116, 289–297.
- Nadler S and Pérez-Ponce de León G** (2011) Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. *Parasitology* 138, 1688–1709.
- Nakao M and Sasaki M** (2021) Trematode diversity in freshwater snails from astopover point for migratory waterfowls in Hokkaido, Japan: an assessment by molecular phylogenetic and population genetic analyses. *Parasitology International* 83, 102329.
- Nollen PM** (1996) The mating behavior of *Echinostoma paraensei* grown in mice. *Journal of Helminthology* 70, 43–45.
- Nowak TS and Loker ES** (2005) *Echinostoma paraensei*: differential gene transcription in the sporocyst stage. *Experimental Parasitology* 109, 94–105.
- Pantoja C, Faltýnková A, O'Dwyer K, Jouet D, Skirnisin K and Kudlai O** (2021) Diversity of echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) in their snail hosts at high latitudes. *Parasite* 28, 59.
- Pérez-Ponce de León G and Poulin R** (2018) An updated look at the uneven distribution of cryptic diversity among parasitic helminths. *Journal of Helminthology* 92, 197–202.
- Pinhoiro J, Maldonado Jr A, Attias M and Lanfredi RM** (2005) Ultrastructure of the miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae). *Parasitology Research* 97, 367–372.
- Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA and Huelsenbeck JP** (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61, 539–542.
- Sereno-Urbe AL, Pinacho-Pinacho CD, Sánchez Cordero V and García-Varela M** (2015) Morphological and molecular analyses of larval and adult stages of *Echinoparyphium recurvatum* von Linstow 1873 (Digenea: Echinostomatidae) from central Mexico. *Journal of Helminthology* 89, 458–464.
- Souza JGR, Garcia JS, Gomes APN, Machado-Silva, JR and Maldonado Jr A** (2017a) Comparative pattern of growth and development of *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae) in hamster and Wistar rat using light and confocal laser scanning microscopy. *Experimental Parasitology* 13, 41–49.
- Souza JGR, Lopes-Torres EJ, Garcia JS, Gomes APN, Rodrigues-Silva R, Maldonado Jr A and Machado-Silva JR** (2017b) Light and scanning electron microscopy study of in vitro effects of artesunate in newly excysted metacercariae of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Digenea). *Experimental Parasitology* 174, 10–16.
- Sullivan JT and Richards CS** (1981) *Schistosoma mansoni*, NIH-SM-PR-2 strain, in susceptible and nonsusceptible stocks of *Biomphalaria glabrata*: comparative histology. *Journal of Parasitology* 67, 702–708.
- Tkach VV, Littlewood DTJ, Olson PD, Kinsella JM and Swiderski Z** (2003) Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). *Systematic Parasitology* 56, 1–15.
- Tkach VV, Kudlai O and Kostadinova A** (2016) Molecular phylogeny and systematics of the Echinostomatoidea Looss, 1899 (Platyhelminthes: Digenea). *International Journal for Parasitology* 46, 1–15.
- Toledo R** (2009) Echinostomes in the definitive host: a model for the study of host-parasite relationships. In Fried B and Toledo R (eds), *The Biology of Echinostomes: From the Molecule to the Community*. New York: Springer Science + Business Media, pp. 89–110.
- Toledo R and Fried B** (2005) Echinostomes as experimental models for interactions between adult parasites and vertebrate hosts. *Trends in Parasitology* 21, 251–254.
- Toledo R, Esteban JG and Fried B** (2009) Recent advances in the biology of echinostomes. *Advances in Parasitology* 69, 147–204.
- Travassos L, Teixeira de Freitas JF and Kohn A** (1969) Trematódeos do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 67, 1–886.
- Valadão MC, López-Hernández D, Alves PV and Pinto HA** (2022) A new species of *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) from the 'revolution' group found in Brazil: refuting the occurrence of *Echinostoma miyagawai* (= *E. robustum*) in the Americas. *Parasitology* 149, 325–336.

Capítulo 3: Posição filogenética de *Echinostoma nephrocystis*: elucidando a proximidade entre espécies brasileira e africana de *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae)

Artigo a ser submetido para *Parasitology Research*

Neste trabalho, o objetivo principal foi avaliar por meio de microscopia ótica e análises moleculares (genes 28S, ITS e *nad1*), parasitos adultos do gênero *Echinostoma* com 37 espinhos no colar cefálico, obtidos experimentalmente em aves (*Columba livia* e *Serinus canaria*) inoculadas com metacercárias obtidas de *S. marmorata* naturalmente infectado em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Resumo

Os trematódeos do gênero *Echinostoma* são parasitos de aves e mamíferos com ampla distribuição mundial, historicamente reconhecidos por apresentar taxonomia complexa. Além de informações como biogeografia, interações parasito-hospedeiro e morfologia, dados moleculares dos parasitos são necessários para identificação precisa de espécies, sobretudo avaliar a distribuição daquelas classificadas como cosmopolitas. Nas últimas décadas, o uso de dados moleculares tem permitido ampliar nosso conhecimento a respeito da taxonomia e diversidade de *Echinostoma*. No Brasil, embora mais de 25 espécies do gênero tenham sido descritas, a maior parte delas ainda não foi avaliada em estudos filogenéticos. Neste trabalho, parasitos adultos obtidos experimentalmente em aves (*Columba livia* e *Serinus canaria*) inoculadas com metacercárias obtidas do gastrópode fisídeo *Stenophysa marmorata* de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, foram utilizados para caracterização morfológica (microscopia óptica) e molecular (amplificação e sequenciamento de regiões parciais dos genes 28S e *nad1*). Os parasitos adultos analisados concordam com a descrição original de *Echinostoma nephrocystis*, espécie com 37 espinhos no colar cefálico descrita há quase um século na mesma região geográfica. Nas análises moleculares, as árvores filogenéticas obtidas a partir das sequências 28S mostram que a espécie avaliada é parte do complexo 'revolutum', sendo verificado um agrupamento com *Echinostoma caproni*, espécie originária da África (divergência molecular: 0,1–0,2%). As análises envolvendo o marcador mitocondrial *nad1* também demonstraram maior proximidade de *E. nephrocystis* com essa espécie africana (divergência molecular: 7,9 a 9%). Uma comparação morfológica entre *E. nephrocystis* e *E. caproni* revelam homogeneidade substancial de caracteres. A possível ancestralidade entre essas espécies de *Echinostoma* é discutida.

Palavras-chave: *Echinostoma nephrocystis*; Brasil; taxonomia; filogenia.

Abstract

Trematodes of the genus *Echinostoma* are parasites of birds and mammals with a worldwide distribution, historically recognized for their complex taxonomy. In addition to information such as biogeography, host-parasite interactions and morphology, molecular data of these parasites are necessary for the precise identification of species, especially to assess the distribution of those classified as cosmopolitan. In the last decades, the use of molecular data has allowed us to expand our knowledge regarding the taxonomy and diversity of *Echinostoma*. In Brazil, although more than 25 species of the genus have been described, most of them have not yet been evaluated in phylogenetic studies. In this work, adult parasites obtained experimentally from birds (*Columba livia* and *Serinus canaria*) inoculated with metacercariae obtained from the freshwater snail *Stenophysa marmorata* from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, were used for morphological (optical microscopy) and molecular characterization (amplification and sequencing of partial regions of 28S and *nad1* genes). The adult worms analyzed conform closely to the original description of *Echinostoma nephrocystis*, 37-collar-spined species described almost a century ago in the same geographic region. In the molecular analyses, the phylogenetic trees obtained from the 28S sequences show that the species is part of the 'revolutum' complex, clustering with *Echinostoma caproni*, a species from Africa (molecular divergence: 0.1–0.2%). Analyzes involving the mitochondrial marker *nad1* also showed greater proximity between *E. nephrocystis* and this African species (molecular divergence: 7.9 to 9%). A morphological comparison between *E. nephrocystis* and *E. caproni* reveals substantial homogeneity of characters. The possible ancestry between these species of *Echinostoma* is discussed.

Keywords: *Echinostoma nephrocystis*; Brazil; taxonomy; phylogeny.

Introdução

Alguns trematódeos digenéticos com semelhanças morfológicas significativas em seus diferentes estágios de desenvolvimento reportados em territórios geograficamente distantes, cujas populações estão isoladas entre si, têm sido considerados cosmopolitas (Laidemitt *et al.*, 2019). É o caso das espécies do gênero *Echinostoma* Rudolphi, 1809, que infectam aves e mamíferos em todo o mundo e até o momento, foram descritas mais de 120 espécies nominais (Kostadinova e Gibson, 2000). Todavia, a identificação precisa das espécies de *Echinostoma* tem sido problemática devido à homogeneidade interespecífica de características morfológicas, perda/indisponibilidade do material-tipo e identificação incorreta de isolados sequenciados (Kostadinova e Gibson, 2000; Pantoja *et al.*, 2021).

Ferramentas moleculares têm permitido investigar as relações taxonômicas e diversidade genética em *Echinostoma*, possibilitando a descoberta de complexos de espécies dentro do grupo ‘*revolutum*’ (Vilas *et al.*, 2005; Detwiler *et al.*, 2010; Georgieva *et al.*, 2014; Izrailskaia *et al.*, 2021). Essas abordagens são essenciais para a delimitação de espécies e ampliam o conhecimento acerca da diversidade e distribuição do grupo ‘*revolutum*’ (Morgan e Blair, 1998; Georgieva *et al.*, 2014; Blasco-Costa *et al.*, 2016).

A sistemática das espécies de *Echinostoma* da América do Sul é complexa, uma vez que a maioria delas foram descritas exclusivamente a partir de estudos morfológicos (Fernandes *et al.*, 2015). Entre as espécies relatadas no Brasil, encontra-se *Echinostoma nephrocystis* Lutz, 1924, descrita a partir de parasitos obtidos experimentalmente em pombos (*Columba livia* Gmelin, 1789) e saracura (*Aramides* sp.). A homogeneidade interespecífica de caracteres com outras espécies do grupo ‘*revolutum*’ somada à inexistência de sequências moleculares, levantam questionamentos sobre sua validade taxonômica (Beaver, 1937; Kostadinova e Gibson, 2000; Chai *et al.*, 2020).

Embora os estudos taxonômicos integrativos de *Echinostoma* da América do Sul estejam evoluindo gradativamente, apenas 3 espécies possuem dados moleculares, isto é, *E. maldonadoi*, *E. paraensei* e *E. pseudorobustum* (Morgan e Blair, 1998; Valadão *et al.*, 2022, 2023). A escassez de dados moleculares desses parasitos sul-americanos ainda é um obstáculo ao esclarecimento de questões relativas à taxonomia e suas relações filogenéticas com outros membros do grupo (Laidemitt *et al.*, 2019). Destarte, no presente estudo, caracterizamos uma espécie de *Echinostoma* morfológicamente identificada como *E. nephrocystis* utilizando uma abordagem taxonômica integrativa e os resultados

obtidos revelam sua posição filogenética em relação às espécies congêneras que ainda não havia sido avaliada.

Material e métodos

Estudo morfológico

Os parasitos adultos foram obtidos a partir da infecção experimental de aves *Columba livia* Gmelin, 1789 (Columbidae) e *Serinus canaria* (Linnaeus, 1758) (Fringilidae), em estudo experimental iniciado a partir de metacercárias recuperadas de *Stenophysa marmorata* (Guilding, 1828) (Physidae) naturalmente infectada em um lago urbano em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, realizado previamente no laboratório.

O material para estudo morfológico e morfométrico já se encontrava em preparações permanentes. Para o estudo do colar cefálico, alguns espécimes tiveram sua extremidade anterior seccionada com auxílio de lâmina de bisturi, transferida para lâmina de vidro e clarificada com lactofenol. As preparações foram examinadas ao microscópio para determinação do número, tamanho, forma e disposição dos espinhos do colar, conforme Fried *et al.* (2009). Os parasitos adultos foram fotografados com auxílio de uma câmera digital Leica ICC50 HD acoplada ao estereomicroscópio. Já os colares cefálicos de alguns exemplares adultos foram fotografados com uma câmera digital acoplada ao microscópio Leica DM500 e analisados com *software* Leica Application Suite (LAZ EZ), versão 2.0 (Leica Microsystems, Alemanha).

As análises morfométricas foram baseadas em medidas tomadas por meio de uma ocular milimetrada e comparadas às descrições morfológicas de outras espécies do gênero que possuem 37 espinhos no colar cefálico, corpo lanceolado e vitelárias bem desenvolvidas. As abreviaturas utilizadas nas descrições morfológicas estão de acordo com as descrições mais recentes de *Echinostoma* por Kostadinova (2005) e Georgieva *et al.* (2017), bem como disponíveis em trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa (Valadão *et al.*, 2022, 2023).

Os *vouchers* dos exemplares adultos montados em lâminas permanentes serão depositados na Coleção de Trematódeos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-TRE).

Estudo molecular

Um parasito adulto foi fixado em etanol 95% e mantida a -20°C em *freezer* localizado no Laboratório de Taxonomia de Trematoda. A extração de DNA foi realizada usando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do DNA extraído foi estimada usando um espectrofotômetro de microvolume NanoDrop® ND-1.000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Regiões parciais dos genes 28S rDNA e *nad1* mtDNA foram amplificadas usando os *primers* Dig-12/1500R e NDJ11/NDJ2a, respectivamente (Tkach *et al.*, 2003; Kostadinova *et al.*, 2003).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 μL , incluindo 12,5 μL de Platinum® Hot Start Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific), 1,25 pmol de cada *primer*, aproximadamente 50 ng de DNA modelo e 8,75 μL de ddH₂O. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e a banda do tamanho esperado foi purificada com 20% de polietilenoglicol 8000 (Promega) em solução de NaCl 2,5 M. O DNA purificado foi sequenciado em ambas as direções por eletroforese capilar em um sequenciador ABI3730 usando o *kit* Big Dye® Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems, Estados Unidos)

Cromatogramas de sequência obtidos foram alinhados por correspondência nucleotídica e editados usando o *software* ChromasPro versão 2.0.1 (Technelysium Pty Ltd, Austrália) e os consensos foram comparados a outras sequências disponíveis no banco de dados de sequências de nucleotídeos GenBank utilizando as buscas da Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) (Altschul *et al.*, 1990). Sequências duplicadas não foram adicionadas às análises. As sequências dos genes foram alinhadas usando a ferramenta MUSCLE implementada no *software* Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versão X para conjuntos de dados nuclear e mitocondrial (Kumar *et al.*, 2018). Os alinhamentos foram cortados para corresponder à sequência mais curta antes das análises filogenéticas. Os modelos evolutivos utilizados para as análises foram determinados pelo critério de informação Bayesiana (BIC) de informação no MEGA X para cada marcador selecionado, correspondendo a GTR + G + I para 28S e TN93 + G para *nad1*. Grupos externos para cada conjunto de dados foram escolhidos com base em estudos filogenéticos moleculares anteriores, incluindo representantes de *Echinostoma* e táxons relacionados (Tkach *et al.*, 2016; Georgieva *et al.*, 2017). A Máxima

Verossimilhança (MV) e a Inferência Bayesiana (IB) foram os métodos utilizados para gerar as hipóteses filogenéticas.

As análises de MV foram realizadas no MEGA X e os suportes dos clados foram estimados pelo método não-paramétrico de *bootstrap* com 1000 replicatas. As análises de IB foram realizadas com MrBayes v.3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) usando método de Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC) por 10^6 gerações e amostragem a cada 100 gerações. O ‘*burn-in*’ foi estabelecido para os primeiros 25% das árvores amostradas e os suportes nodais foram estimados por probabilidade posterior. As árvores obtidas por IB foram visualizadas no *software* FigTree versão 1.4.3. As árvores geradas foram editadas por meio do *software* Adobe Photoshop® v.22.4.3 (Adobe Inc., Estados Unidos) e quando demonstravam topologias semelhantes, eram agrupadas em uma só e os valores de suportes nodais obtidos por cada análise eram exibidos em cada clado.

Todas as sequências contíguas montadas e editadas foram submetidas e disponibilizadas no GenBank (números de acesso mostrados na seção Resultados). Além disso, o acesso ao patrimônio genético tem sido registrado à medida em que os trabalhos científicos são publicados.

Resultados

Sumário taxonômico

Echinostoma nephrocystis Lutz, 1924

Hospedeiro intermediário natural: *Stenophysa marmorata* (Guilding, 1828)

Hospedeiros definitivos experimentais: *Columba livia* Gmelin, 1789; *Serinus canaria* (Linnaeus, 1758)

Localidade: Belo Horizonte (19°89'4" S 43°91'9" O)

Sítio de infecção: intestino delgado

Sequências de DNA representativas: 28S XXXX e *nad1* XXXX

Descrição (Figura 1 a–c) [Baseada em 9 espécimes adultos (14 dpi) obtidos através de infecção experimental; medidas obtidas apresentadas na Tabela 1]. Corpo lanceolado a alongado (BW 22–27% nos exemplares de pombo e BW 31–41% nos exemplares de canário), achatado dorsoventralmente, apresentando largura máxima na região uterina. Pode haver a presença de uma constrição na região média da ventosa ventral. Distância pré-acetabular curta, representando 16 e 18% em média do comprimento total do corpo para os exemplares de pombo e de canário, respectivamente. Tegumento composto por numerosos espinhos em forma de escamas dispostos em fileiras alternadas que iniciam após o colar cefálico, densos até a região do esôfago (nos exemplares de canário) ou até a região do ovário (nos exemplares de pombo) e se tornam espaçados até a região pós-testicular. Colar cefálico reniforme, bem desenvolvido, correspondendo a 26–38% da largura máxima do corpo em exemplares obtidos de canário e 30–41% naqueles exemplares obtidos de pombos. Espinhos do colar cefálico conspícuos, em número de 37, dispostos da seguinte forma: 5 espinhos angulares (3 orais e 2 aborais), 6 espinhos laterais em única fileira e 15 espinhos dorsais alternados. Espinhos angulares orais, laterais e dorsais de tamanhos similares e angulares aborais, ligeiramente maiores que os demais. Ventosa oral subterminal, esférica e muscular. Ventosa ventral bem desenvolvida, muscular, esférica, localizada na região pré-equatorial do corpo, em média 4 vezes maior que a ventosa oral. Pré-faringe curta, faringe muscular, alongada-oval. Esôfago curto, ocupando entre 4–8% do comprimento total do corpo, bifurcando em cecos intestinais previamente à bolsa do cirro. Cecos intestinais laterais, estendendo até a extremidade

posterior, sobrepostos em partes pelas vitelárias. Dois testículos, em tandem, lisos a ligeiramente identados, alongados transversalmente, localizados a uma distância correspondente entre 16 e 31% da extremidade posterior do corpo nos exemplares obtidos de canário e 23–30% nos exemplares obtidos de pombo. Bolsa do cirro transversalmente oval, localizada entre a bifurcação intestinal e a borda anterior da ventosa ventral, contendo vesícula seminal, pars prostatica bem desenvolvida, ducto ejaculatório e cirro com superfície lisa. Poro genital entre a bifurcação intestinal e margem anterior da ventosa ventral. Ovário oval ou ligeiramente alongado transversalmente, pós-equatorial. Glândula de Mehlis mediana, contígua ao ovário e transversalmente oval. Útero intercecal com bastantes giros, ocupando 19–24% do comprimento total do corpo nos exemplares de canário e 24–26% nos exemplares de pombo, contendo numerosos ovos amarelados. Vitelárias laterais com abundantes folículos, estendendo-se desde o nível da margem posterior da ventosa ventral até a extremidade posterior do corpo. Após os testículos, as vitelárias se confluem, aproximando da linha mediana, podendo ou não se unir.

Comentários taxonômicos

Os parasitos adultos obtidos experimentalmente pertencem ao complexo de espécies ‘*revolutum*’ devido à presença de 37 espinhos no colar cefálico. A morfologia dos espécimes adultos é compatível com a descrição original e revisão da espécie *Echinostoma nephrocystis* (Lutz, 1924; Kohn e Fernandes, 1975) nos seguintes caracteres: tamanho e formato do corpo lanceolado e suas proporções, formato do colar cefálico e espinhos, relação entre as ventosas oral e ventral, e distribuição das vitelárias que se confluem após testículo posterior, se aproximando da linha mediana (Figura 1). Atualizamos alguns dados proporcionais como fornecidos/indicados na chave taxonômica de Kostadinova (2005) para iluminar como se comportam os dados em relação às medidas do corpo.

Utilizamos as características morfológicas do formato do corpo lanceolado e número de espinhos no colar cefálico das espécies descritas ou citadas para América do Sul e África como critérios para comparação com *E. nephrocystis*. Essas características, sobretudo o formato do corpo, impulsionaram a comparação com *Echinostoma luisreyi* Maldonado Jr *et al.* (2003) obtido experimentalmente de roedores no Brasil; *Echinostoma rodriguesi* descrito por Hsu *et al.* (1968) no Brasil e encontrado em *Rattus norvegicus*

naturalmente infectado na Argentina (Sutton e Lunaschi, 1994) e com a espécie africana *Echinostoma caproni* Richard, 1964.

Ainda que possuam moluscos da mesma família (Gastropoda: Physidae) como primeiros hospedeiros intermediários, *E. nephrocystis* se diferencia dos espécimes de *E. luisreyi* (30 dpi) por ser um parasito relativamente menor (BL 2,9–6,9 vs. 5,3–6,5 mm), possuir distância pré-acetabular proporcionalmente maior (FORE 15–22 vs. 13 %), distância pós-testicular proporcionalmente mais curta (TEND 16–32 vs. 40 %). E comparando à *E. rodriguesi*, *E. nephrocystis* diferencia-se por possuir distância pré-acetabular e pós-testicular proporcionalmente maiores (FORE 15–22 vs. 13–14 %; TEND 16–32 vs. 33–36 %).

Echinostoma nephrocystis também foi comparado aos diferentes registros de *E. caproni* que além da descrição original, inclui também as espécies descritas como *Echinostoma liei* Jeyarasasingam *et al.*, 1972 (Egito) e *Echinostoma togoensis* Jourdan e Kulo, 1981 (Togo), posteriormente sinonimizadas com *E. caproni*. A maioria dos dados morfométricos e medidas proporcionais foram compatíveis entre *E. nephrocystis* e *E. caproni*, exceto pelo uso do primeiro hospedeiro intermediário e distribuição geográfica.

Análises moleculares

Sequências parciais de ambos os genes (28S: 1054 pb; *nad1*: 344 pb) foram geradas com sucesso e as árvores filogenéticas reconstruídas usando IB e MV apresentaram topologias semelhantes. Assim, optamos por utilizar as árvores geradas por IB como modelo para árvore de consenso, mas com os valores de suporte dos ramos para ambas as análises.

As análises de 28S contendo 16 sequências representantes de *Echinostoma* suportaram fortemente a hipótese que nosso isolado pertence ao gênero, exibindo variação interespecífica de 0,1–1,4% em relação a outras espécies congênicas incluídas nas análises. Dentro do clado de *Echinostoma*, *E. nephrocystis* agrupou em um clado bem suportado com duas sequências de *E. caproni*, originário da África (Figura 2).

Um conjunto de dados contendo 22 espécies/linhagens de *Echinostoma* foi incluído nas análises da sequência parcial do gene mitocondrial *nad1* de *E. nephrocystis* (344 pb). Essas análises demonstraram que *E. nephrocystis* é geneticamente próxima de *E. caproni*, com base no clado distinto e bem suportado formado por estas. Contudo, a divergência molecular entre as duas espécies variou entre 7,9 a 9%, sugerindo fortemente

se tratarem de espécies distintas. Em relação a outras espécies do gênero *Echinostoma*, embora a resolução das árvores tenha sido em sua maioria pobre, resultando em clados fracamente suportados, exibiam divergência interespecífica de 11,9 a 18,6% (Figura 3).

Discussão

Os parasitos adultos obtidos experimentalmente de *S. canaria* e *C. livia* neste estudo correspondem às características morfológicas e expandem os intervalos morfométricos apresentados na descrição original e revisão de *E. nephrocystis*. Embora já tenha sido reportado que variações morfométricas sejam padrões úteis para discriminar diferenças interespecíficas (Kostadinova *et al.*, 2000), as ligeiras variações observadas entre os espécimes obtidos neste estudo em dois hospedeiros distintos, poderiam indicar algum nível de plasticidade fenotípica induzida pelo hospedeiro, mas não suficiente para caracterizar como espécies distintas de *Echinostoma* (Beaver, 1937). Vale ressaltar ainda que a validade de *E. nephrocystis* também é suportada por dados moleculares e que estudos futuros utilizando abordagens robustas comparativas, poderão revelar até uma maior variabilidade intraespecífica.

Das espécies de *Echinostoma* possuindo 37 espinhos no colar cefálico, com corpo lanceolado e vitelárias bem desenvolvidas, *E. nephrocystis* se assemelha à *E. luisreyi* e *E. rodriguessi*, descritas na América do Sul e à *E. caproni*, espécie descrita na África. Morfologicamente, quando comparada à *E. luisreyi*, foram observadas características marcantes que o distinguem de *E. nephrocystis* como: tamanho do parasito adulto e posição proporcional dos órgãos. Ademais, *E. luisreyi* possui como característica particular a morfometria e arranjo dos espinhos angulares do colar cefálico, apresentando relação 1: 1,7 entre o menor espinho oral e o maior espinho aboral (Maldonado Jr *et al.*, 2003), evidência que não foi observada em nossos exemplares.

Echinostoma rodriguessi foi descrito originalmente a partir de cercárias obtidas de um molusco *Physella acuta* (Draparnaud, 1805) coletado na mesma localidade do nosso isolado (Belo Horizonte, Minas Gerais) (Hsu *et al.*, 1968). Outro registro da espécie foi feito por Sutton e Lunaschi (1994) a partir de ratos naturalmente infectados em Buenos Aires, Argentina. Embora possuam algumas características similares aos espécimes de *E. nephrocystis*, *E. rodriguessi* possui distâncias pré-acetabular (FORE %) e pós-testicular (TEND %) proporcionalmente maiores. Esse critério de distinção proporcional entre espécies foi utilizado recentemente com sucesso ao revelar a espécie *Echinostoma*

pseudorobustum Valadão *et al.* (2022). Contudo, a validade taxonômica de *E. rodriguessi* controversa e ainda não esclarecida, requer dados moleculares. Desde a década de 90, foi levantada uma hipótese se a espécie seria sinônima de *E. trivolvis*, contudo, até o momento, *E. trivolvis* continua sendo restrito a América do Norte e a sinonímia não foi comprovada (Kanev, 1994; Kostadinova e Gibson, 2000; Fried e Graczyk, 2004; Chai *et al.*, 2020). Assim como *E. luisreyi*, não foi possível avaliar a posição filogenética de *E. rodriguessi*, pois não há dados moleculares disponíveis.

A divergência nucleotídica usando *nad1* entre *E. nephrocystis* e *E. caproni* (7,9–9%) é consideravelmente maior quando comparadas espécies reconhecidamente crípticas como *E. revolutum sensu stricto* e *E. revolutum sensu lato* (0,3–5,8%). Todavia, as semelhanças morfológicas e a monofilia entre *E. nephrocystis* do Novo Mundo e a espécie africana *E. caproni* poderiam sugerir uma ancestralidade comum durante a dissolução de Gondwana. A exemplo disso, há pelo menos 6 décadas, Manter (1963) demonstrou que espécies de trematódeos de peixes sul-americanos tinham seus parentes mais próximos na região afro-indiana. O registro de espécies de *Echinostoma* com características morfológicas sobrepostas, mas em continentes distintos, como *E. nephrocystis* e *E. caproni*, é possibilitada pela distribuição de seus hospedeiros, visto que o uso de aves aquáticas migratórias como hospedeiros definitivos poderia contribuir para a ocorrência de uma mesma espécie entre África e América do Sul (Laidemitt *et al.*, 2019). Investigações adicionais poderão ajudar a desvendar padrões de dispersão de *Echinostoma* em ambos os lados do Atlântico, assim como estudos que elucidaram a dispersão de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, introduzido no Brasil há mais de 500 anos, mas cujo hospedeiro intermediário mais suscetível já se encontrava no país antes mesmo de o trematódeo chegar (Morgan *et al.*, 2001).

Este estudo fornece as primeiras sequências moleculares (28S e *nad1*) para *E. nephrocystis* e também a conectam à *E. caproni* descrita no continente africano, ressaltando a necessidade de estudos futuros sobre a origem e especiação de *Echinostoma* que possam fornecer informações importantes para inquéritos epidemiológicos, visto que algumas espécies do gênero já foram reportadas como potencialmente zoonóticas (Toledo e Esteban, 2016; Chai *et al.*, 2020).

Embora os limites de espécies de *Echinostoma* do Brasil sejam pouco definidos devido à escassez de estudos taxonômicos integrativos, as sequências moleculares aqui obtidas para *E. nephrocystis* em associação com a caracterização morfológica de adultos,

forneem uma estrutura integradora para estudos futuros sobre a diversidade de espécies do complexo '*reolutum*'.

Referências

- ALTSCHUL, S.F. *et al.* Basic Local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410, 1990. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- BEAVER, P.C. (1937) **Experimental studies on *Echinostoma revolutum* (Frölich) a fluke from birds and mammals**. Illinois Biological Monographs 15, 96 pp.
- BLASCO-COSTA, I. *et al.* Molecular approaches to trematode systematics: ‘best practice’ and implications for future study. **Systematic Parasitology**, v. 93, p. 295–306, 2016. doi: 10.1007/s11230-016-9631-2.
- CHAI, J.Y. *et al.* Taxonomy of *Echinostoma revolutum* and 37-collar-spined *Echinostoma* spp.: a historical review. **Korean Journal of Parasitology**, v. 58, p. 343–371, 2020. doi: 10.3347/kjp.2020.58.4.343.
- DETWILER, J.T.; BOS, D.H.; MINCHELLA, D.J. Revealing the secret lives of cryptic species: Examining the phylogenetic relationships of echinostome parasites in North America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 611–620, 2010. doi: 10.1016/j.ympev.2010.01.004.
- FERNANDES, B. M. M. *et al.* **South American trematodes parasites of birds and mammals**. Rio de Janeiro: Oficina de Livros, 2015.
- FRIED, B.; GRACZYK, T.K. Recent advances in the biology of *Echinostoma* species in the ‘*revolutum*’ group. **Advances in Parasitology**, v. 58, p. 139–195, 2004. doi: 10.1016/S0065-308X(04)58003-X.
- FRIED, B.; KANEV, I.; REDDY, A. Studies on collar spines of echinostomatid trematodes. **Parasitology Research**, v. 105, p. 605–608, 2009. doi: 10.1007/s00436-009-1519-5.
- GEORGIEVA, S.; BLASCO-COSTA, I.; KOSTADINOVA, A. Molecular characterization of four echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) from birds in New Zealand, with descriptions of *Echinostome novaezealandense* n. sp. and *Echinoparyphium poulini* n. sp. **Systematic Parasitology**, v. 94, p. 477–497, 2017. doi: 10.1007/s11230-017-9712-x.
- GEORGIEVA, S. *et al.* *Echinostoma* ‘*revolutum*’ (Digenea: Echinostomatidae) species complex revisited: species delimitation based on novel molecular and morphological data gathered in Europe. **Parasites e Vectors**, v. 7, n. 520, 2014. doi: 10.1186/s13071-014-0520-8.
- HSU, K.C.; LIE, K.J.; BASCH, P.F. The life history of *Echinostoma rodriguesi* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). **Journal of Parasitology**, v. 54, p. 333–339, 1968.
- IZRAILSKAIA, A.V.; BESPROZVANNYKH, V.V.; TATONOVA, Y.V. *Echinostoma chankensis* nom. nov., other *Echinostoma* spp. and *Isthmiophora hortensis* in East Asia: Morphology, molecular data and phylogeny within Echinostomatidae. **Parasitology**, v. 148, p. 1366–1382, 2021. doi: 10.1017/S0031182021000950.

JEYARASASINGAM, U. *et al.* Life cycle of a new echinostome from Egypt, *Echinostoma liei* sp.nov. (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology**, v. 65, p. 203–222, 1972. doi: 10.1017/s0031182000044991.

JOURDANE, J.; KULO, S.D. Etude expérimentale du cycle biologique de *Echinostoma togoensis* n. sp., parasite à l'état larvaire de *Biomphalaria pfeifferi* au Togo. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 56, p. 477–488, 1981. doi: 10.1051/parasite/1981565477.

KANEV, I. Life-cycle, delimitation and redescription of *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) (Trematoda: Echinostomatidae). **Systematic Parasitology**, v. 28, p. 125–144, 1994. doi: 10.1007/BF00009591.

KOHN, A.; FERNANDES, B.M.M. Sobre as espécies do gênero *Echinostoma* Rudolphi, 1809 descritas por Adolpho Lutz em 1924. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 73, n. 1–2, 1975. doi: 10.1590/S0074-02761975000100006.

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

KOSTADINOVA, A.; GIBSON, D. I. The systematics of the echinostomes. *In*: FRIED, B.; GRACZYK, T. K. (eds.) **Echinostomes as experimental models for biological research**. Dordrecht: Springer, p. 31–52, 2000. doi: 10.1007/978-94-015-9606-0.

KOSTADINOVA, A. *et al.* A quantitative approach to the evaluation of the morphological variability of two echinostomes, *Echinostoma miyagawai* Ishii, 1932 and *E. revolutum* (Frölich, 1802), from Europe. **Systematic Parasitology**, v. 45, p. 1–15, 2000. doi: 10.1023/A:1006232612469.

KOSTADINOVA, A. *et al.* Phylogenetic relationships of *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) and related genera re-assessed via DNA and morphological analyses. **Systematic Parasitology**, v. 54, p. 159–176, 2003.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547–1549, 2018. doi: 10.1093/molbev/msy096.

LAIDEMITT, M. R. *et al.* The diverse echinostomes from East Africa: with a focus on species that use *Biomphalaria* and *Bulinus* as intermediate hosts. **Acta Tropica**, v. 193, p. 38–49, 2019. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.01.025.

LUTZ, A. Estudos sobre a evolução dos endotrematodes brasileiros. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 17, p. 55–57, 1924.

MALDONADO JR, A.; VIEIRA, G. O.; LANFREDI, R. M. *Echinostoma luisreyi* n. sp. (Platyhelminthes: Digenea) by light and scanning electron microscopy. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 800–808, 2003. doi: 10.1645/GE-3095.

- MANTER, H. W. The zoogeographical affinities of trematodes of South American freshwater fishes. **Systematic Zoology**, v. 12, p. 45–70, 1963. doi: 10.1016/0014-4894(55)90024-2.
- MORGAN, J. *et al.* *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: Past history and future trends. **Parasitology**, v. 123, p. 211–228, 2001. doi:10.1017/S0031182001007703.
- MORGAN, J.A.T.; BLAIR, D. Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacers and mitochondrial CO1 and ND1 genes for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda). **Parasitology**, v. 116, p. 289–297, 1998. doi: 10.1017/s0031182097002217.
- PANTOJA, C. *et al.* Diversity of echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) in their snail hosts at high latitudes. **Parasite**, v. 28, n. 59, 2021. doi: 10.1051/parasite/2021054.
- RICHARD, J. Espèces de la famille Echinostomatidae Poche 1926. **Annales de Parasitologie**, v. 39, p. 607–620, 1964. doi: 10.1051/parasite/1964395607.
- RONQUIST, F. *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539–542, 2012. doi: 10.1093/sysbio/sys029.
- SUTTON, C. A.; LUNASCHI, L. I. Estudio sobre digeneos parásitos de roedores Cricetidae y Muridae, de la provincia de Buenos Aires, Argentina. **Neotropica**, v. 40, p. 61–72, 1994.
- TKACH, V. V.; KUDLAI, O.; KOSTADINOVA, A. Molecular phylogeny and systematics of the Echinostomatoidea Looss, 1899 (Platyhelminthes: Digenea). **International Journal for Parasitology**, v. 46, p. 1–15, 2016.
- TKACH, V. V. *et al.* Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 1–15, 2003.
- TOLEDO, R.; ESTEBAN, J.G. An update on human echinostomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, p. 37–45, 2016. doi: 10.1093/trstmh/trv099.
- VALADÃO, M. C. *et al.* A new cryptic species of *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) closely related to *Echinostoma paraensei* found in Brazil. **Parasitology**, v. 150, p. 337–347, 2023.
- VALADÃO, M. C. *et al.* A new species of *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) from the ‘*revolutum*’ group found in Brazil: refuting the occurrence of *Echinostoma miyagawai* (= *E. robustum*) in the Americas. **Parasitology**, v. 149, p. 325–336, 2022.
- VILAS, R.; CRISCIONE, C. D.; BLOUIN, M. S. A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. **Parasitology**, v. 131, p. 839–846, 2005.

Tabela 1. Comparações morfométricas entre espécies do gênero *Echinostoma* que possuem como característica morfológica marcante o formato do corpo lanceolado. As medidas são apresentadas em μm , salvo indicação contrária. Valores **em negrito** indicam dados obtidos de desenhos. Medidas não fornecidas ou desenhos ausentes são indicados por um traço.

Espécie	<i>Echinostoma nephrocystis</i>		<i>Echinostoma rodriguesi</i>		<i>Echinostoma luisreyi</i>	<i>Echinostoma caproni</i>		
Referência	Presente estudo	Kohn e Fernandes, 1975	Sutton e Lunaschi (1994)	Hsu <i>et al.</i> (1968)	Maldonado Jr. <i>et al.</i> (2003)	Richard, 1964	Jeyarasasingam <i>et al.</i> , 1972	Jourdane e Kulo, 1981
HI	<i>S. marmorata</i> ^N	Physidae ^N ; girinos ^E ; peixinhos ^E	<i>P. acuta</i> ^N ; <i>B. glabrata</i> ^E	–	<i>S. marmorata</i> ^{NE} ; <i>B. glabrata</i> ^E	<i>B. pfeifferi</i> ^N ; <i>P. mascareniensis</i> ^N ; <i>B. liratus</i> ^N	<i>B. alexandrina</i> ^{NE} ; <i>B. glabrata</i> ^E ; <i>B. straminea</i> ^E ; <i>B. truncatus</i> ^E	<i>B. pfeifferi</i> ^{NE} ; <i>B. globosus</i> ^{NE} ; <i>B. glabrata</i> ^E ; <i>B. forskalli</i> ^E ; <i>S. regularis</i> ^E ; <i>A. galamensis</i> ^E ; <i>C. derooi</i> ^E
HD	<i>C. livia</i> ^E <i>S. canaria</i> ^E	<i>Aramides</i> sp. <i>C. livia</i>	<i>G. gallus</i> ; <i>C. livia</i> ; <i>M. musculus</i> ; <i>M. auratus</i> ^(E)	<i>R. norvegicus</i> ^N	<i>M. musculus</i> ^E ; <i>M. auratus</i> ^E	<i>F. newtoni</i> ^N <i>G. gallus</i> ^{E1}	<i>A. platyrhynchos</i> ^N ; <i>R. rattus</i> ^N ; <i>C. olivieri</i> ^N ; <i>B. striata</i> ^E ; <i>C. livia</i> ^E ; <i>G. gallus</i> ^E ; <i>M. musculus</i> ^E ; <i>M. auratus</i> ^E ; <i>R. norvegicus</i> ^E	<i>M. musculus</i> ^E

BL (mm)	4.5–5.3 (4.9±289)	4.4–5.2 (4.7±354)	2.5–4.6	4.1–7.0	4–6.1	3.9–6.8	5.3–6.5	5.7	6–6.7	5.6–8 (6.9)	2.6–5.5 (4.6)
BW (mm)	1.1–1.4 (1.2±139)	1.4–2.1 (1.6±368)	0.7–1.2	0.8–1.4	1.1–1.6	0.6–1.3	1.1–2.3	1.5	1.3–1.4	1.1–1.8 (1.5)	1.2–1.6 (1.4)
BW(%)	22–27	31–41	30–41	19	25	20	25	27	22	31	29
FORE (mm)	0.7–0.9 (0.8±47)	0.7–1.0 (0.9±117)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
FORE (%)	16 (16)	16–22 (18)	19–21	15	14	13	13	15	18	10	16
CL	237–346 (280±40)	218–346 (287±52)	–	–	–	–	–	300	–	–	–
CW	364–455 (419±36)	382–546 (482±79)	–	–	–	315–832	416–642	580	–	360–515 (448)	–
CW/BW (%)	30–41 (35)	26–38 (31)	32–47	42–44	36	35	29	38	40	24	36
Spines	36–37	32–36	30–37	34–37	37	37–41	37–38	37	37	37	37
AOSL	54–74 (60±5)	43–91 (70±12)	–	–	–	60–81	55–64	60–70	60–70	31–81	–
AOSW	–	–	–	–	–	–	15–17	13–20	–	–	–
AASL	53–78 (65±8)	50–92 (69±10)	–	–	–	60–96	60–75	75–85	65–75	31–81	–
AASW	–	–	30–87 x 11–20	41–68 x 15– 23	–	–	15–25	15–20	–	–	–
LSL	30–72 (56±13)	32–92 (67±18)	–	–	–	72–93	64–71	75–85	65–75	52–65 (62)	–
LSW	–	–	–	–	–	–	15–20	15–20	–	–	–
DSL	25–70 (51±10)	27–79 (53±12)	–	–	–	60–81	40–55	60–75	55–60	31–39 (35)	–
DSW	–	–	–	–	–	–	11–17	12–20	–	7	–
OSL	146–182 (164±18)	91–213 (140±52)	121–180	100– 178	110–160	144–276	133–208	230	240– 250	–	190–240 (210)
OSW	164–182 (178±8)	127–213 (176±35)	140–360	125– 250	140–190	132–240	200–292	250	250– 260	140–326 (202)	160–200 (185)

VSL	546–655 (590±60)	583–801 (733±101)	470–620	375– 678	420–610	408–804	517–892	680	630– 650	–	560–670 (615)
VSW	546–765 (626±90)	583–801 (724±103)	420–560	400– 678	420–650	432–720	542–975	700	700– 730	536–721	480–630 (555)
OSW/VS W	1: 3–4.2	1: 3.2–6.3	1:1.5–3.5	1:2.7– 4.5	1:2.5–4	1: 3.9	1: 2.9–3.1	1:3.2	1:3.3	1:4.3	1:2.7
OL	237–255 (251±8)	182–346 (296±78)	120–360	225– 464	100–280	240–480	150–383	400	–	185–391 (285)	170–270 (190)
OL (%)	4–6 (5)	4–8 (6)	6–10	5–7	4	5	4	3	5	1	5
PL	36–55 (51±8)	36–71 (54±14)	–	–	30–130	96	92–150	100	–	23–91 (31)	–
PHL	127–164 (149±15)	182–219 (203±16)	90–167	100– 190	100–150	105–252	142–233	150	–	156–213 (185)	90–170 (130)
PHW	127–164 (138±16)	146–170 (156±13)	90–121	100– 210	80–150	102–204	91–150	200	–	104–182 (150)	110–200 (160)
CSL	106–142 (124±25)	106.4– 120.5 (113.4±10)	–	230– 370	160–350	–	–	270	300– 400	–	–
CSW	213–248 (230±25)	135–170 (152±25)	–	80–120	100–200	–	–	320	450	–	–
ATL	346–419 (371±28)	182–273 (228±43)	130–310	325– 571	190–460	204–444	225–483	700	400	402–752 (549)	380–560 (470)
ATW	437–583 (481±58)	364–455 (419±39)	230–400	375– 678	270–520	180–384	417–833	700	450	309–577 (454)	460–590 (500)
PTL	382–455 (415±33)	255–382 (323±60)	167–420	475– 750	270–680	249–588	433–825	600	400	567–1030 (762)	400–700 (540)
PTW	382–492 (437±51)	346–437 (382±39)	210–400	375– 678	210–500	168–384	317–858	820	450– 550	309–670 (466)	380–550 (470)
OVL	291–328 (302±16)	273–382 (314±52)	140–330	225– 460	–	168–300	125–358	250	200– 280	165–388 (232)	150–260 (180)
OVW	346–492 (422±55)	328–382 (360±23)	150–420	275– 470	–	144–360	225–500	450	350– 380	268–433 (342)	280–380 (330)

TEND (mm)	1.1–1.6 (1.2±185)	0.8–1.5 (1.2±346)	–	–	–	–	–	–	–	–	0.97–1.4 (1.2)
TEND (%)	23–30 (25)	16–31 (25)	28–32	26–29	33	36	41	28	25	33	19
OVAR (mm)	1.1–1.3 (1.2±90)	0.9–1.1 (1.0±83)	–	–	–	–	–	–	–	–	0.7–1.2 (0.9)
OVAR (%)	24–26 (25)	19–24 (22)	9–14	18–21	19	18	19	17	20	22	27
Ovos L	92–106 (101±4)	85–106 (99±4)	98–116	98–111	80–90	96–128	83–100	105–120	100– 115	114–125(121)	115–130 (120)
W	43–57 (49±4)	35–50 (44±6)	56–79	49–72	40–50	56–68	33–41	50–60	50–60	70–83 (74)	60–70 (65)

Medidas destacadas em negrito: calculadas a partir de pranchas disponíveis nos artigos.

–: dados indisponíveis. ^N: hospedeiro natural; ^E: hospedeiro experimental. ¹: Exemplares de Capron reportados por Richard (1964)

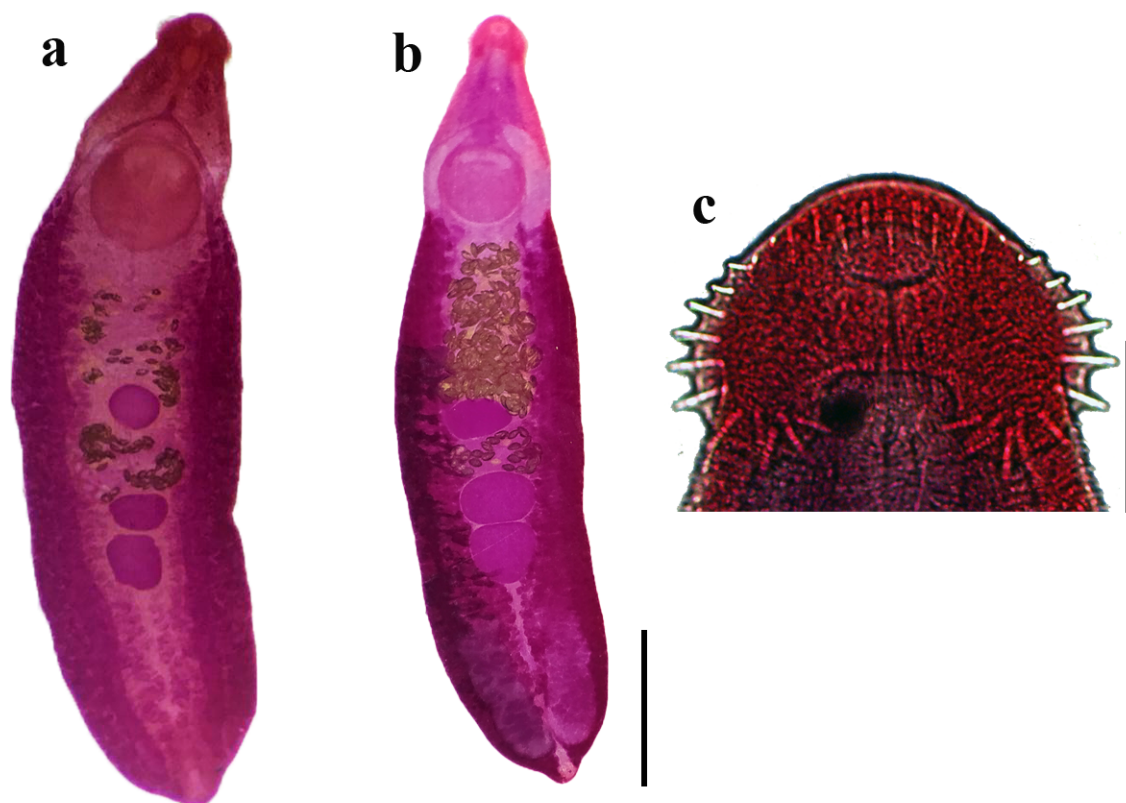


Figura 1 *Echinostoma nephrocystis*. **a)** Parasito adulto obtido experimentalmente de *Serinus canaria*; **b)** Parasito adulto experimentalmente de *Columba livia*; **c)** Colar cefálico com 37 espinhos. Escalas: parasitos adultos 1 mm; colar cefálico 200 μ m.

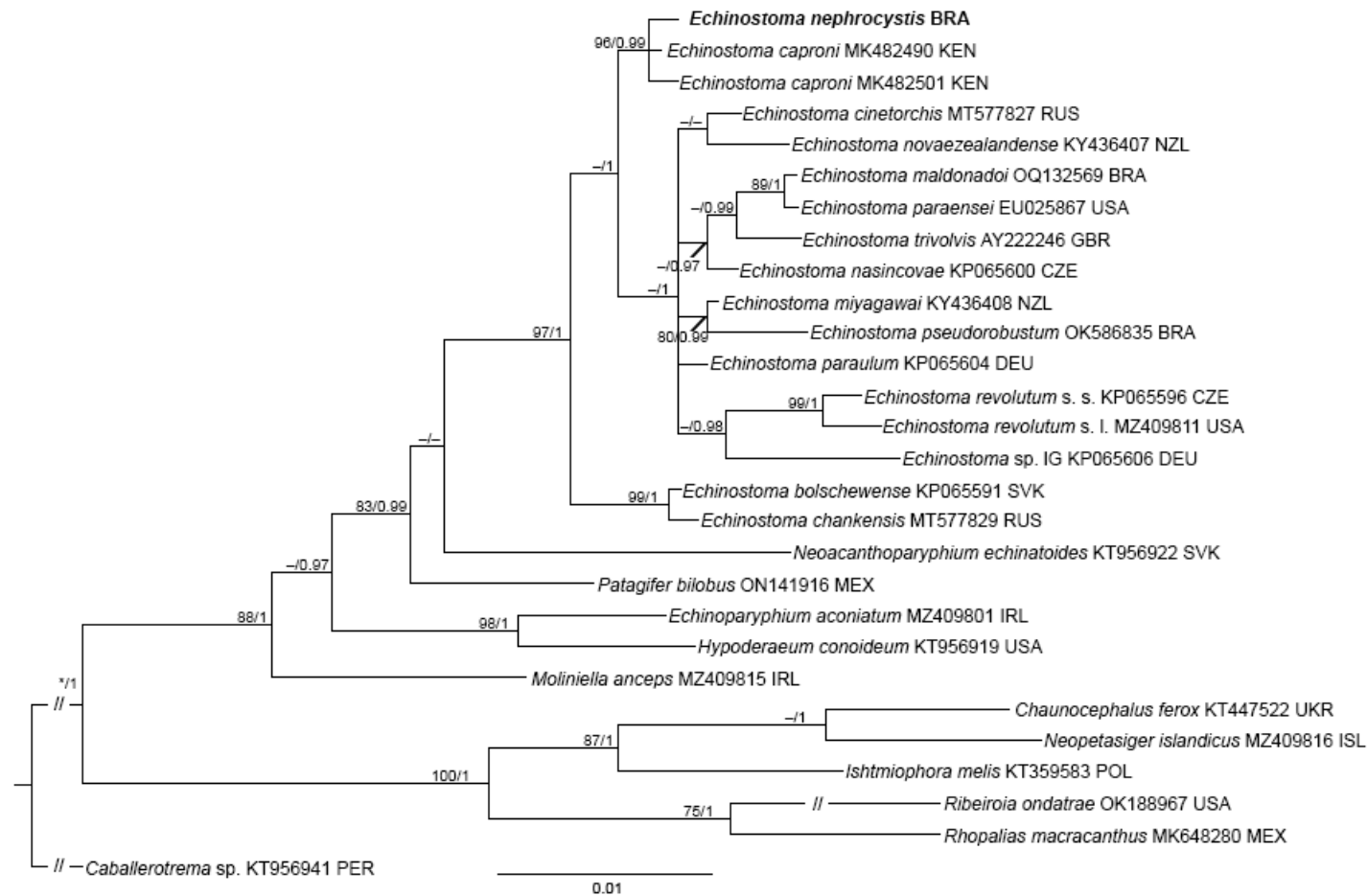


Figura 2 Relações filogenéticas entre *Echinostoma nephrocystis* (em negrito) e outras espécies de *Echinostoma* de 37 espinhos no collar cefálico inferidas a partir de sequências de 28S rDNA (1054 pb; modelo de substituição nucleotídica: GTR + G + I), baseadas em análises de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB). O suporte nodal é indicado como MV/IB. Os valores <0,70 (IB) e <70 (MV) são indicados por um traço.

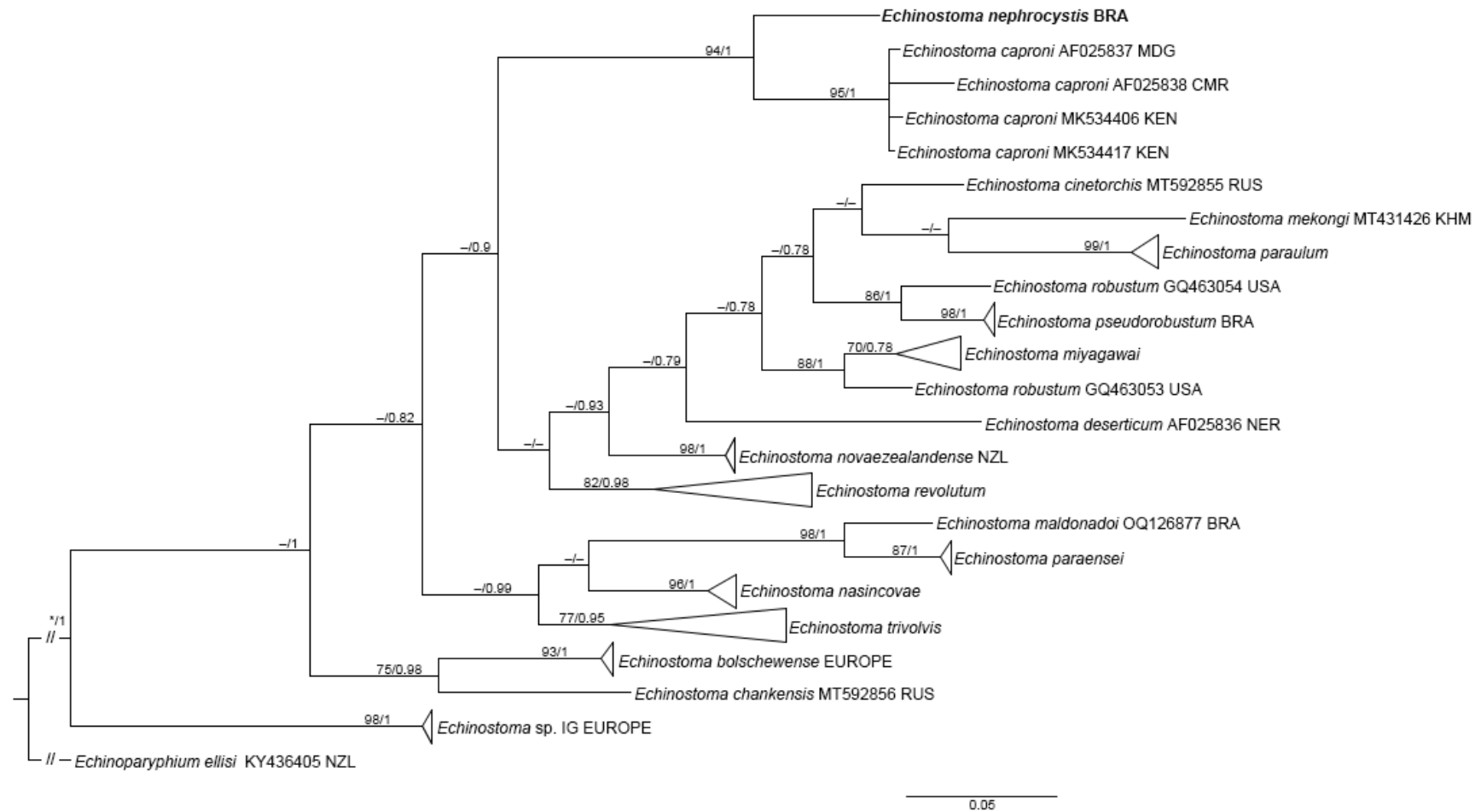


Figura 3 Relações filogenéticas entre *Echinostoma nephrocystis* (em **negrito**) e outras espécies de *Echinostoma* de 37 espinhos no collar cefálico inferidas a partir de sequências de *nad1* mtDNA (344 pb; modelo de substituição nucleotídica: TN93 + G), baseadas em análises de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB). O suporte nodal é indicado como MV/IB. Os valores <0,70 (IB) e <70 (MV) são indicados por um traço.

Capítulo 4: *Echinostoma exile* (Trematoda: Echinostomatidae) revisitado: análises filogenéticas revelam sua afiliação com o gênero *Echinoparyphium*

Artigo a ser submetido à Journal of Helminthology.

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a posição filogenética de uma espécie de *Echinostoma* com 45 espinhos no colar cefálico obtida experimentalmente em gerbil, através de uma abordagem multigênica (28S, ITS e *nad1*).

Resumo

Apesar das contribuições recentes da filogenia molecular para avançar o entendimento sobre o complexo cenário taxonômico relacionado à maioria dos grupos da família Echinostomatidae, há ainda uma escassez de dados genéticos para a fauna destes trematódeos encontrados na América do Sul. É o caso de *Echinostoma exile*, descrito há quase um século no Brasil e aqui submetido a uma abordagem integrativa para avaliação de sua posição filogenética. Os espécimes adultos avaliados foram obtidos em *Meriones unguiculatus* (gerbils) imunossuprimidos com corticosteroides e infectados experimentalmente com estágios larvais do trematódeo recuperados do molusco fisídeo *Stenophysa marmorata* encontrado naturalmente infectados em um lago urbano de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os parasitos obtidos foram submetidos à análise morfológica em microscópio óptico. Para a caracterização molecular, uma abordagem multigênica (28S, ITS e *nad1*) foi utilizada na avaliação da posição filogenética da espécie. Morfológicamente, a espécie analisada é indistinguível de *E. exile*, apresentando como principal característica diferencial a presença de 45 espinhos no colar cefálico. No entanto, as árvores filogenéticas obtidas para os três marcadores genéticos avaliados revelaram a inclusão da espécie em clados contendo espécies do gênero *Echinoparyphium*. Além disso, considerando-se os marcadores nucleares, as divergências genéticas entre o parasito avaliado e *Echinoparyphium* spp. foram menores do que as encontradas para *Echinostoma* spp. (28S: 0,2–1,6% vs 2,8–3,7%; ITS 0,7–1,7% vs 7,5–8%). Diante dos dados obtidos, a diagnose do gênero *Echinoparyphium* deve ser emendada para acomodar a espécie, principalmente no que diz respeito à ausência de diferenças no tamanho dos espinhos dorsais aboral e oral. A possibilidade de outras duas espécies com 45 espinhos no colar cefálico, atualmente atribuídas ao gênero *Echinostoma* na América do Sul também pertencerem a *Echinoparyphium* é discutida.

Palavras-chave: Brasil; Echinostomatidae; relações evolutivas; taxonomia integrativa.

Abstract

Despite the recent contributions of molecular phylogeny to advance the understanding of the complex taxonomic scenario related to most groups of the Echinostomatidae family, there is still a scarcity of genetic data for the fauna of these trematodes found in South America. This is the case of *Echinostoma exile*, described almost a century ago in Brazil and submitted here to an integrative approach to assess its phylogenetic position. The adult specimens evaluated were obtained from *Meriones unguiculatus* (jirds) immunosuppressed with corticosteroids and experimentally infected with larval stages of the fluke recovered from the physid mollusc *Stenophysa marmorata* found naturally infected in an urban lake from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. The worms obtained were submitted to a morphological analysis in an optical microscope. For the molecular characterization, a multigenic approach (28S, ITS and *nad1*) was used in the evaluation of the phylogenetic position of the species. Morphologically, the species analyzed is indistinguishable from *E. exile*, with the presence of 45 spines on the head collar as the main distinguishing characteristic. However, the phylogenetic trees obtained for the three genetic markers evaluated revealed the inclusion of the species in clades containing species of the genus *Echinoparyphium*. Furthermore, considering the nuclear markers, the genetic differences between the evaluated parasite and *Echinoparyphium* spp. are smaller than those found for *Echinostoma* spp. (28S: 0.2–1.6% vs. 2.8–3.7%; ITS 0.7–1.7% vs. 7.5–8%). Given the data obtained, the diagnosis of the genus *Echinoparyphium* must be amended to accommodate the species, especially with regard to the absence of differences in the size of the aboral and oral dorsal spines. The possibility that two other species with 45 spines on the head collar, currently assigned to the genus *Echinostoma* in South America, also belong to *Echinoparyphium* is discussed.

Keywords: Brazil; Echinostomatidae; evolutionary relationships; integrative taxonomy.

Introdução

Echinostomatidae compreende um diverso grupo de trematódeos digenéticos que parasitam, quando adultos, uma ampla variedade de aves e mamíferos (Kostadinova e Gibson, 2000; Toledo *et al.*, 2014; Tkach *et al.*, 2016). A identificação desses parasitos, sobretudo das espécies dos gêneros *Echinostoma* Rudolphi, 1809 e *Echinoparyphium* Dietz, 1909, tem sido considerada problemática devido à presença de espécies morfológicamente semelhantes, descrições inadequadas e em muitos casos, pela ausência de *vouchers* depositados em coleções taxonômicas (Kostadinova e Gibson, 2000; Georgieva *et al.*, 2013; Toledo *et al.*, 2014). Assim, as espécies foram agrupadas em complexos de espécies, considerando similaridades morfobiológicas, principalmente relacionadas ao número de espinhos no colar cefálico. Isso levou a criação do complexo ‘*revolutum*’ para espécies de *Echinostoma* que possuem 37 espinhos no colar cefálico e do complexo ‘*recurvatum*’ para espécies de *Echinoparyphium* que possuem 45 espinhos no colar cefálico (Kostadinova e Gibson, 2000; Fried, 2001).

Atualmente, os estudos integrativos têm fornecido base sólida para investigar a variação genética em espécies de Echinostomatidae. Uma alta diversidade de linhagens crípticas tem sido demonstrada para diferentes grupos, especialmente para as espécies de *Echinostoma* pertencentes ao complexo ‘*revolutum*’ (Georgieva *et al.*, 2013, 2014; Faltýnková *et al.*, 2015; Izrailskaia *et al.*, 2021; Valadão *et al.*, 2022, 2023). No entanto, em contraste com estes avanços verificados para a fauna destes trematódeos presentes na América do Norte e Europa, nossa compreensão sobre a taxonomia de equinostomatídeos no Brasil permanece incompleta. De fato, embora mais de 25 espécies terem sido reportada no país (Fernandes *et al.*, 2015), a maioria quase que absoluta das espécies não possuem sequências moleculares disponíveis.

Entre as espécies de *Echinostoma* registradas no Brasil, encontra-se *Echinostoma exile* Lutz, 1924, espécie com 45 espinhos no colar cefálico descrita a partir de parasitos obtidos através de infecções experimentais de pombo doméstico, *Columba livia* Gmelin, 1789 (Columbidae), e de frango-de-água-azul, *Porphyrio martinica* (Linnaeus, 1766) (Rallidae). Estas aves foram inoculadas com metacercárias encontradas em moluscos aquáticos da cidade do Rio de Janeiro (Lutz, 1924). Apesar de ser conhecida há quase um século, os estudos envolvendo essa espécie são escassos, limitando-se a sua redescritção (Kohn e Fernandes, 1975) e ao encontro e caracterização dos seus estágios larvais encontrados no molusco fisídeo *Stenophysa marmorata* (Guilding, 1828) no estado de

Minas Gerais (Pinto e Melo, 2012). Até o momento, sequências moleculares e estudos avaliando a posição filogenética dessa espécie são inexistentes.

No presente estudo, a posição filogenética de *E. exile* foi avaliada pela primeira vez. Os dados obtidos não suportaram a inclusão dessa espécie no gênero *Echinostoma*, mas sim em *Echinoparyphium*. Diante desse resultado, aspectos da morfologia e biologia da espécie foram revisitados e contextualizados com o conhecimento taxonômico relacionado ao gênero *Echinoparyphium*.

Material e métodos

Estudo morfológico

Os parasitos adultos foram obtidos a partir da infecção experimental de gerbil *Meriones unguiculatus* (Milne-Edwards, 1867), em estudo iniciado a partir de um espécime do molusco fisídeo, *S. marmorata*, encontrado naturalmente infectado em um lago urbano de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (19° 49' S, 43° 57' O), em março de 2017. Metacercárias recuperadas do molusco foram inoculadas por via oral (50 metacercárias/animal) a gerbils (n=5), os quais receberam diariamente, por via subcutânea, fosfato dissódico de dexametasona (25 mg/kg). Este protocolo imunossupressor teve como objetivo aumentar a suscetibilidade dos animais à infecção experimental. A eutanásia e necropsia dos roedores foram realizadas após 15 dias para a recuperação de parasitos adultos.

Os parasitos obtidos foram fixados, corados e montados em lâminas permanentes de acordo com as técnicas helmintológicas descritas em Valadão *et al.* (2022, 2023). As preparações obtidas foram examinadas em microscópio óptico para caracterização morfológica. Os parasitos foram fotografados com uma câmera digital acoplada ao microscópio Leica DM500 e analisados com auxílio do *software* Leica Application Suite (LAZ EZ), versão 2.0 (Leica Microsystems, Alemanha). As análises morfométricas foram baseadas em medidas tomadas por meio de uma ocular micrometrada ou pela análise das fotos obtidas. A classificação dos tipos de espinhos do colar cefálico (angular, lateral e dorsal) segue Kostadinova (2005). As abreviaturas utilizadas nas descrições morfológicas estão de acordo com as descrições mais recentes de *Echinostoma* por Kostadinova (2005) e Georgieva *et al.* (2017) bem como disponíveis em trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa (Valadão *et al.*, 2022, 2023). Em alguns casos, diante da ausência de

informações nos trabalhos descritivos, as medidas proporcionais foram calculadas a partir das ilustrações disponíveis em artigos correspondentes às espécies. A identificação morfológica dos espécimes obtidos foi realizada com auxílio de chaves de identificação, revisões taxonômicas e trabalhos descritivos realizados por diferentes autores (Lutz, 1924; Kohn e Fernandes 1975, Pinto e Melo, 2012). Os exemplares examinados foram depositados na Coleção de Trematódeos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-TRE).

Estudo molecular

A extração de DNA de um espécime previamente fixado em etanol 95% e mantido a -20°C em *freezer* até processamento, foi realizada usando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do DNA extraído foi estimada usando um espectrofotômetro de microvolume NanoDrop® ND-1.000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Como marcadores genéticos alvo para as análises, considerou-se regiões parciais do gene 28S rDNA (*primers* Dig-12/1500R, Tkach *et al.*, 2003), a região ITS1-5.8S-ITS2 (*primers* BD1/BD2, Kostadinova *et al.*, 2003) e o gene mitocondrial *nad1* (*primers* NDJ11/NDJ2a; Luton *et al.*, 1992). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL, incluindo 12,5 µL de Platinum® Hot Start Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific), 1,25 pmol de cada *primer*, aproximadamente 50 ng de DNA modelo e 8,75 µL de ddH₂O. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% para se avaliar a presença das bandas de tamanho esperado para cada marcador. Em seguida, o restante do produto de PCR foi purificado com 20% de polietilenoglicol 8000 (Promega) em solução de NaCl 2,5 M. O DNA purificado foi sequenciado em ambas as direções por eletroforese capilar em um sequenciador ABI3730 usando o *kit* Big Dye® Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems, Estados Unidos).

Cromatogramas de sequência obtidos foram alinhados por correspondência nucleotídica e editados usando o *software* ChromasPro versão 2.0.1 (Technelysium Pty Ltd, Austrália) e os consensos foram comparados a outras sequências disponíveis no banco de dados de sequências de nucleotídeos GenBank utilizando as buscas por *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST®) (Altschul *et al.*, 1990). As sequências de cada gene foram alinhadas individualmente usando a ferramenta MUSCLE implementada no

software MEGA versão X (Kumar *et al.*, 2018). Os alinhamentos foram cortados para corresponder à sequência mais curta antes das análises filogenéticas.

Os modelos evolutivos utilizados para as análises foram determinados pelo critério de informação Bayesiana (BIC) de informação no MEGA X para cada marcador selecionado, correspondendo a GTR + G + I para 28S, K2 + G + I para ITS e GTR + G + I para *nad1*. Grupos externos foram escolhidos com base em filogenias recentes de Echinostomatoidea (Tkach *et al.*, 2016). A Máxima Verossimilhança (MV) e a Inferência Bayesiana (IB) foram os métodos utilizados para gerar as hipóteses filogenéticas. As análises de MV foram realizadas no MEGA X e os suportes dos clados foram estimados pelo método de *bootstrap* com 1000 replicatas. As análises de IB foram realizadas com MrBayes v.3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) usando método de Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC) por 10⁶ gerações e amostragem a cada 100 gerações. O “*burn-in*” foi estabelecido para os primeiros 25% das árvores amostradas e os suportes dos ramos foram estimados por probabilidade posterior. As árvores obtidas por IB foram visualizadas no *software* FigTree versão 1.4.3. As árvores geradas foram editadas por meio do *software* Adobe Photoshop® v.22.4.3 (Adobe Inc., Estados Unidos). As sequências contíguas montadas foram depositadas no GenBank.

Resultados

Um total de 7 parasitos adultos foram recuperados no intestino delgado de 4/5 espécimes de *M. unguiculatus* experimentalmente infectados (Figura 1). A morfologia e medidas dos exemplares analisados (Figura 1 e 2; Tabela 1) são compatíveis com as descritas para *E. exile* por Lutz (1924), Kohn e Fernandes (1975) e Pinto e Melo (2012). Por outro lado, as análises moleculares realizadas para os três marcadores genéticos avaliados revelaram a inclusão dos parasitos obtidos em clados bem suportados contendo representantes do gênero *Echinoparyphium*, não suportando a inclusão dos mesmos no gênero *Echinostoma*, conforme apresentado a seguir.

Considerando-se os dados obtidos a partir da análise da sequência parcial do gene 28S (1055 pb; 54 sequências de 36 espécies), os parasitos identificados morfologicamente como *E. exile* ficaram dentro de um grande clado contendo espécies do gênero *Echinoparyphium*, clado-irmão de *Echinostoma* (Figura 3). Foi verificado a formação de um subclado com *Hypoderaeum conoideum* (Bloch, 1782) (distância genética de 0,67%), mas o suporte do ramo foi baixo. Já as análises de ITS1-5.8S-ITS2 (1004 pb; 20

sequências de 18 espécies) contendo duas novas sequências de *E. exile* exibiram agrupamento em um clado denominado de Novo Mundo neste estudo, por conter espécies do gênero *Echinoparyphium* obtidas no continente americano, isto é, *Echinoparyphium recurvatum* (von Linstow, 1873) do México e linhagens 1 e 3 de *Echinoparyphium* spp. dos Estados Unidos (0,73–1,35% de distância genética). Novamente, as espécies de *Echinostoma* se agruparam em um clado único, bem suportado e distinto de *Echinoparyphium* (7,5–8%) (Figura 4). As análises do marcador mitocondrial *nad1* (450 pb, 37 sequências de 29 espécies) concordaram com as análises dos marcadores nucleares, sendo verificado o agrupamento da espécie aqui caracterizada com representantes do gênero *Echinoparyphium* (Figura 5).

Diante dos dados filogenéticos obtidos, *Echinostoma exile* deve ser alocado no gênero *Echinoparyphium*. Para isso, uma emenda neste gênero, conforme apresentado abaixo.

Sumário Taxonômico

Família Echinostomatidae Looss, 1899

Gênero *Echinoparyphium* Dietz, 1909

Diagnose: como em Kostadinova (2005), com emenda sobre os seguintes caracteres: espinhos dorsais aborais e orais podem possuir ou não tamanhos subiguais; ovário pré-equatorial a equatorial; distância pré-acetabular muito curta a muito longa (9–40%); região pós-testicular curta a muito longa (15–35%); campo uterino variável, muito curto a longo (3–27%).

Echinoparyphium exile (Lutz, 1924) nov. comb.

(sin. *Echinostoma exile* Lutz, 1924)

Primeiro hospedeiro intermediário: *Stenophysa marmorata* (Guilding, 1828)

Hospedeiro definitivo natural: desconhecido

Localidade: Lagoa do Nado em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (19° 49' S, 43° 57' O)

Outras localidades: Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil (22° 54' 13" S; 43° 12' 35" O); lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (19° 50' 18" S; 43° 59' 40" O)

Dados moleculares: XXXX 28S; XXXX ITS; XXXX *nad1*.

Adultos (Fig 1 e 2, Tabela 1): Corpo alongado, afilado posteriormente, apresentando largura máxima ao nível da ventosa ventral. Tegumento armado com pequenos espinhos em forma de escamas. Colar cefálico bem desenvolvido, reniforme, com 45 espinhos: 5 angulares, 11 laterais em cada lado e 13 espinhos dorsais. Espinhos dorsais aborais e orais de tamanho subiguais. Ventosas oral e ventral subesféricas. Relação entre as ventosas em média 1: 4. Pré-faringe muito curta ou ausente. Faringe muscular. Esôfago relativamente longo, ocupando em média 5% do comprimento total do corpo. Testículos em tandem, alongados longitudinalmente, geralmente lisos, pós-equatoriais, correspondendo aproximadamente 25–30% do comprimento total do corpo. Ovário esférico, localizado na região equatorial do corpo, anterior aos testículos. Região uterina curta, correspondendo em média a 16% do comprimento total do corpo, com poucas alças e poucos ovos intrauterinos. Vitelária folicular, na porção posterior do corpo, em ambas as laterais, sem campos coincidentes.

Comentários Taxonômicos

Os parasitos adultos obtidos experimentalmente de *M. unguiculatus* neste estudo, bem como os caracterizados como *E. exile* por diferentes autores (Kohn e Fernandes, 1975; Pinto e Melo, 2012) morfologicamente se enquadram na diagnose atual do gênero *Echinostoma* apresentada por Kostadinova (2005), exceto por alguns exemplares serem pequenos (< 5 mm), espinhos em sua maioria em dupla fileira, formato dos testículos, vitelárias não atingem a ventosa ventral anteriormente, abundância de ovos intrauterinos e a medida proporcional do campo uterino em relação ao comprimento do corpo (OVAR %). Entretanto, as análises filogenéticas aqui apresentados demonstraram não haver suporte para a manutenção da espécie no gênero *Echinostoma*, sendo a sua transferência para o gênero *Echinoparyphium* aqui realizada. Para isso, é necessária a emenda na diagnose do gênero apresentada acima para contemplar a morfologia dos espinhos dorsais (aborais e orais subiguais em *Ep. exile* nov. comb.), a posição do ovário (pré-equatorial em *Ep. exile* nov. comb.); comprimento da região pós-testicular (muito longa em *Ep. exile* nov. comb.) e o campo uterino [longo (até 27%) em *Ep. exile* nov. comb.]. Considerando-se o número de espinhos, várias espécies do gênero *Echinoparyphium* também possuem 45 espinhos no colar cefálico (e.g. *Ep. recurvatum*, *Ep. pseudorecurvatum*, *Ep. flexum*,

Ep. hydromyos, *Ep. ellisi* e *Ep. mordwilkoii*), contudo, nestas espécies, há diferença substancial entre o comprimento dos espinhos dorsais aborais e orais. Outras três espécies de *Echinostoma* com 45 espinhos foram registradas na América do Sul, a saber: *E. jacanae*, *E. neglectum* e *E. siticulosum*. A análise dos dados morfológicos disponíveis permite a distinção entre as espécies, uma vez que haveria hipótese de pertencerem ao gênero *Echinoparyphium*.

E. jacanae difere de *Ep. exile* por serem parasitos mais delgados (BW 9–11 vs. 13–21 %), distância pré-acetabular até duas vezes maior (22–25 vs. 9–14 %), formato dos testículos alongados-ovais como observados no gênero *Echinostoma*, os ovos são menores (82–97 x 48–59 vs. 93–121 x 56–75 µm). E, apesar dos espinhos dorsais do colar cefálico possuírem tamanhos similares, são maiores em comprimento e não são pontiagudos como em *Ep. exile* (Lunaschi *et al.*, 2018).

E. siticulosum difere de *Ep. exile* por apresentar espinhos dorsais orais maiores que aborais no colar cefálico, útero repleto de ovos, maior distância pré-acetabular (17 vs. 9–14 %), e menor comprimento da região pós-testicular (12 vs. 18–35 %) (Dietz, 1910).

Ep. neglectum ex. *Nyctanassa violacea cayennensis* se diferencia de *Ep. exile* apenas por apresentar abundante número de ovos intrauterinos, característica marcante do gênero *Echinostoma*. A similaridade morfológica e a descrição das espécies a partir de estudos experimentais iniciados com estágios larvais obtidos de moluscos aquáticos de um mesmo local, poderia indicar a possibilidade de se tratarem de uma mesma espécie (Lutz, 1924). Todavia, para essa conclusão, estudos adicionais são necessários.

Discussão

A abordagem taxonômica integrativa aqui realizada para o estudo de uma espécie de equinostomatódeo morfológicamente associada ao gênero *Echinostoma* desde a descrição original realizada há quase um século, resultou na sua transferência para o gênero *Echinoparyphium*, como *Echinoparyphium exile* nov. comb. No presente estudo, os resultados apresentados adicionam complexidade a diferenciação entre as espécies do gênero *Echinoparyphium*, tendo em vista que a principal característica diferencial do gênero, i.e., a diferença de tamanho entre os espinhos dorsais orais e aborais do colar cefálico, não é verificada em *Ep. exile*.

É interessante mencionar que os dados obtidos apontam para a existência de uma ampla variabilidade morfológica entre as espécies deste gênero, somando-se a resultados anteriores que sugerem fortemente que as espécies do gênero *Hypoderaeum* também devem ser alocadas neste gênero (Kostadinova *et al.*, 2003; Tkach *et al.*, 2016; Pantoja *et al.*, 2021). De fato, a espécie tipo deste gênero, *Hypoderaeum conoideum*, agrupou-se com *Ep. exile* na análise 28S, contudo com baixos valores de suporte. Isolados de uma outra espécie de *Echinostoma* com 45 espinhos no colar cefálico descrita da Ásia, *Echinostoma macrorchis* Ando e Ozaki, 1923, também se agrupou no clado de *Echinoparyphium* em análises realizadas com sequências ITS-2 e *nad1* (Butboonchoo *et al.* 2020). Esses dados apontam para o fato de que outras espécies de Echinostomatidae poderão vir a ser transferidas para *Echinoparyphium* no futuro. Assim, *Echinoparyphium* parece ter uma diversidade muito maior entre seus membros do que se pensava anteriormente, suportada por estudos filogenéticos recentes, e poderia sugerir a ocorrência de uma convergência evolutiva entre estes trematódeos.

As análises realizadas com sequências ITS revelaram que *Ep. exile* se agrupou em um clado denominado de Novo Mundo, englobando parasitos identificados como *Ep. recurvatum* (KJ435271) do México e *Echinoparyphium* sp. linhagens 1 e 3 (GQ463135, GQ463138) dos Estados Unidos, sendo que as cercárias da linhagem 1 apresentavam 43 espinhos no colar cefálico e aquelas classificadas como linhagem 3, os autores não souberam informar quantos espinhos haviam no colar cefálico (Detwiler *et al.*, 2010).

Por outro lado, alguns achados requerem notas de cautela, como o fato de algumas sequências identificadas como “*Echinostoma revolutum*” (MW001028) e “*Euparyphium* sp.” (MW001031) terem agrupado no clado de *Echinoparyphium*. A ausência de dados morfológicos para essas sequências depositadas por Duan *et al.* (2021) inviabiliza esclarecer a identidade correta dessas espécies. Além disso, a sequência nomeada “*Echinoparyphium* sp.” (MW001018) correspondente ao isolado Ba289 depositada diretamente no GenBank pelos mesmos autores, não foi corretamente relacionada ao trabalho correspondente informado no banco de dados. Além disso, a posição filogenética da sequência como grupo-irmão de outras espécies que se encaixaram no clado de *Echinoparyphium*, dificulta a compreensão se esta seria mais uma espécie do gênero ou de um gênero intimamente relacionado.

Nas análises utilizando o marcador mitocondrial *nad1*, o isolado do presente estudo agrupou com uma sequência denominada no GenBank como “*Echinostoma ilocanum*” da Tailândia (diferença genética de 16,7%). Vale ressaltar que essa sequência

não foi formalmente descrita e/ou justificada em publicação taxonômica, nem mesmo possui *voucher* depositado em alguma coleção para estudos comparativos, ainda que a espécie já tenha sido descrita em outros locais do sudeste asiático (Sohn *et al.*, 2011; Chai *et al.*, 2018).

As primeiras sequências genéticas foram geradas neste estudo para uma espécie de *Echinoparyphium* presente no Brasil e os resultados desafiam a distinção entre os gêneros *Echinostoma* e *Echinoparyphium*, uma vez que alguns caracteres semelhantes de *Ep. exile* com membros do gênero *Echinostoma* não refletem uma ancestralidade comum entre os táxons. Considerando-se algumas características biológicas como tipo de hospedeiro e morfologia dos estágios larvais, vale a pena mencionar que parece haver algum grau de especificidade para os moluscos hospedeiros intermediários, tendo em vista que várias espécies de *Echinoparyphium* são encontradas infectando exclusivamente espécies de Physidae (Kanev *et al.*, 2000), como verificado para *Ep. exile*.

Todavia, nas duas últimas décadas de estudo, observou-se que as espécies de *Echinoparyphium*, assim como as espécies de *Echinostoma*, podem utilizar uma gama maior de hospedeiros como moluscos das famílias Bulinidae, Lymnaeidae, Planorbidae e Valvatidae (Kostadinova *et al.*, 2003; Detwiler *et al.*, 2010; Tkach *et al.*, 2016; Georgieva *et al.*, 2017; Laidemitt *et al.*, 2019; Pantoja *et al.*, 2021). Por outro lado, quando se considera a morfologia das cercárias de *Ep. exile* previamente descritas por Pinto e Melo (2012), algumas características como a quantidade e disposição das glândulas de penetração, o tipo de cauda (sem membranas natatórias), o tamanho e quantidade dos grânulos calcários presentes nos canais excretores principais, se assemelham ao descrito para diferentes espécies de *Echinoparyphium* (Yamaguti, 1975). Ao se considerar as metacercárias, a espessura da parede cística, relativamente mais fina em *Ep. exile*, também concorda com conhecido para *Echinoparyphium* spp., se diferenciando da parede cística mais espessa descrita para espécies de *Echinostoma* por diferentes autores (Yamaguti, 1975; Fried *et al.*, 1998; Fried e Graczyk, 2000; Huffman e Fried, 2012; Pinto e Melo, 2012).

Novos estudos a fim de esclarecer as questões sobre a riqueza de espécies de Echinostomatidae que ocorrem no Brasil e iluminar as relações filogenéticas deste grupo são necessários. Tais estudos poderão contribuir para uma classificação que reflita as relações filogenéticas entre os membros deste grupo de trematódeos reconhecidamente considerados detentores de uma complexa taxonomia.

Referências

- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic Local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410, 1990. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- CHAI, J. Y. *et al.* *Echinostoma ilocanum* infection in two residents of Savannakhet Province, Lao PDR. **Korean Journal Parasitology**, v. 56, p. 75–79, 2018. doi: 10.3347/kjp.2018.56.1.75.
- DETWILER, J. T.; BOS, D. H.; MINCHELLA, D. J. Revealing the secret lives of cryptic species: examining the phylogenetic relationships of echinostomoid parasites in North America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 611–620, 2010. doi: 10.1016/j.ympev.2010.01.004.
- ENABULELE, E. E. *et al.* Molecular epidemiological analyses reveal extensive connectivity between *Echinostoma revolutum* (*sensu stricto*) populations across Eurasia and species richness of zoonotic echinostomatids in England. **PLoS ONE**, v. 18, n. e0270672, 2023. doi: 10.1371/journal.pone.0270672.
- FALTÝNKOVÁ, A. *et al.* A re-assessment of species diversity within the ‘*revolutum*’ group of *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) in Europe. **Systematic Parasitology**, v. 90, p. 1–25, 2015. doi: 10.1007/s11230-014-9530-3.
- FERNANDES, B. M. M. *et al.* **South American trematodes parasites of birds and mammals**. Rio de Janeiro: Oficina de Livros, 2015.
- FRIED, B. Biology of echinostomes except *Echinostoma*. **Advances in Parasitology**, v. 49, p. 163–210, 2001. doi: 10.1016/s0065-308x(01)49040-3.
- GEORGIEVA, S.; BLASCO-COSTA, I.; KOSTADINOVA, A. Molecular characterization of four echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) from birds in New Zealand, with descriptions of *Echinostome novaezealandense* n. sp. and *Echinoparyphium poulini* n. sp. **Systematic Parasitology**, v. 94, p. 477–497, 2017. doi: 10.1007/s11230-017-9712-x.
- GEORGIEVA, S. *et al.* *Echinostoma* ‘*revolutum*’ (Digenea: Echinostomatidae) species complex revisited: species delimitation based on novel molecular and morphological data gathered in Europe. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 520, 2014. doi: 10.1186/s13071-014-0520-8.
- GEORGIEVA, S. *et al.* New cryptic species of the ‘*revolutum*’ group of *Echinostoma* (Digenea: Echinostomatidae) revealed by molecular and morphological data. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 64, 2013. doi: 10.1186/1756-3305-6-64.
- IZRAILSKAIA, A. V.; BESPROZVANNYKH, V. V.; TATONOVA, Y. V. *Echinostoma chankensis* nom. nov., other *Echinostoma* spp. and *Isthmiophora hortensis* in East Asia: morphology, molecular data and phylogeny within Echinostomatidae. **Parasitology**, v. 148, p. 1366–1382, 2021. doi: 10.1017/S0031182021000950.

KANEV, I.; FRIED, B.; RADEV, V. Collar spine models in the genus *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v. 105, p. 921–927, 2009. doi: 10.1007/s00436-009-1475-0.

KANEV, I. *et al.* An overview of the biology of echinostomes. *In*: FRIED, B.; GRACZYK, T. K. (eds.) **Echinostomes as experimental models for biological research**. Dordrecht: Springer, p. 1–29, 2000. doi: 10.1007/978-94-015-9606-0.

KOHN, A.; FERNANDES, B. M. M. Sobre as espécies do gênero *Echinostoma* Rudolphi, 1809 descritas por Adolpho Lutz em 1924. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 73, n. 1–2, 1975. doi: 10.1590/S0074-02761975000100006.

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

KOSTADINOVA, A.; GIBSON, D.I. The systematics of the echinostomes. *In*: FRIED, B.; GRACZYK, T. K. (eds.) **Echinostomes as experimental models for biological research**. Dordrecht: Springer, p. 31–52, 2000. doi: 10.1007/978-94-015-9606-0.

KOSTADINOVA, A. *et al.* Phylogenetic relationships of *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) and related genera re-assessed via DNA and morphological analyses. **Systematic Parasitology**, v. 54, p. 159–176, 2003. doi: 10.1023/a:1022681123340.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547–1549, 2018. doi: 10.1093/molbev/msy096.

LAIDEMITT, M. R. *et al.* The diverse echinostomes from East Africa: with a focus on species that use *Biomphalaria* and *Bulinus* as intermediate hosts. **Acta Tropica**, v. 193, p. 38–49, 2019. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.01.025.

LUNASCHI, L. I.; DRAGO, F. B.; NUNEZ, V. Two new species of *Echinostoma* (Digenea: Echinostomatidae) from Argentinean birds. **Revista Mexicana de Biodiversidade**, v. 89, p. 356–364, 2018. doi: 10.22201/ib.20078706e.2018.2.2026.

LUTON, K.; WALKER, D.; BLAIR, D. Comparison of ribosomal internal transcribed spacer from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 56, p. 323–328, 1992. doi: 10.1016/0166-6851(92)90181-i.

LUTZ, A. Estudos sobre a evolução dos endotrematódeos brasileiros. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 17, p. 55–57, 1924.

MORGAN, J. A. T.; BLAIR, D. Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacers and mitochondrial CO1 and ND1 genes for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda). **Parasitology**, v. 116, p. 289–297, 1998. doi: 10.1017/s0031182097002217.

PANTOJA, C. *et al.* Diversity of echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) in their snail hosts at high latitudes. **Parasite**, v. 28, n. 59, 2021. doi: 10.1051/parasite/2021054.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. *Physa marmorata* (Molusca: Physidae) as intermediate host of *Echinostoma exile* (Trematoda: Echinostomatidae) in Brazil. **Neotropical Helminthology**, v. 6, n. 2, p. 291–299, 2012.

RONQUIST, F. *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539–542, 2012. doi: 10.1093/sysbio/sys029.

SOHN, W. M. *et al.* *Echinostoma ilocanum* infection in Oddar Meanchey Province, Cambodia. **Korean Journal Parasitology**, v. 49, p. 187–190, 2011 doi: 10.3347/kjp.2011.49.2.187.

SUTTON, C.A.; LUNASCHI, L.I. Estudio sobre digeneos parásitos de roedores Cricetidae y Muridae, de la provincia de Buenos Aires, Argentina. **Neotropica**, v. 40, p. 61–72, 1994.

TKACH, V. V.; KUDLAI, O.; KOSTADINOVA, A. Molecular phylogeny and systematics of the Echinostomatoidea Looss, 1899 (Platyhelminthes: Digenea). **International Journal for Parasitology**, v. 46, p. 1–15, 2016. doi: 10.1016/j.ijpara.2015.11.001.

TKACH, V. V. *et al.* Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 1–15, 2003. doi: 10.1023/A:1025546001611.

TOLEDO, R. *et al.* History of Echinostomes (Trematoda). **Acta Parasitologica**, v. 59, p. 553–565, 2014. doi: 10.2478/s11686-014-0302-7.

VALADÃO, M. C. *et al.* A new cryptic species of *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) closely related to *Echinostoma paraensei* found in Brazil. **Parasitology**, v. 150, p. 337–347, 2023. doi: 10.1017/S003118202300001X.

VALADÃO, M. C. *et al.* A new species of *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae) from the ‘*revolutum*’ group found in Brazil: refuting the occurrence of *Echinostoma miyagawai* (= *E. robustum*) in the Americas. **Parasitology**, v. 149, p. 325–336, 2022. doi: 10.1017/S0031182021001864.

Tabela 1 Comparação entre *Echinoparyphium exile* (Lutz, 1924) nov. comb. e outras espécies de Echinostomatidae com 45 espinhos no colar cefálico reportadas na América do Sul. Medidas expressas em micrômetros, salvo indicação contrária.

Espécies	<i>Echinoparyphium exile</i>			<i>Echinostoma siticulosum</i>	<i>Echinoparyphium scapteromae</i>	<i>Echinostoma jacanae</i>
	Presente estudo	Pinto e Melo (2012)	Kohn e Fernandes (1975)	Dietz (1909, 1910)	Sutton e Lunaschi (1994)	Lunaschi <i>et al.</i> (2018)
HI	—	<i>Stenophysa marmorata</i> ^N	—	—	—	—
HD	—	<i>Biomphalaria glabrata</i> ^E	Physidae ^N	—	—	—
	<i>M. unguiculatus</i> ^E	<i>C. livia</i> ^E ;	<i>C. livia</i> ^E	<i>Crypturellus undulatus</i> ^N ; <i>C. variegatus</i> ^N ; <i>C. noctivagus</i> ^N	<i>Scapteromys aquaticus</i> ^N ; <i>Rattus norvegicus</i> ^N	<i>Jacana jacana</i> ^N
BL (mm)	4,1 ± 467 (3,6–4,7)	5,7 ± 1148 (4,6–6,9)	4,3–5,9	5,5–7,5	2,8 (1,6–3,5)	3,8–5,2
BW (mm)	0,7 ± 45 (0,7–0,8)	1,0 ± 350 (0,7–1,4)	0,8–0,9	0,7–0,94	0,8 (0,5–0,9)	0,4–0,5
BW(%)	18 (15–21)	14–15	13	—	—	9–11
FORE (mm)	0,5 ± 100 (0,4–0,6)	—	—	—	—	0,9–1,3
FORE (%)	13 (10–14)	11–14	9–10	—	—	22–25
CL	183 ± 18 (164–214)	—	—	—	—	179–198
CW	311 ± 19 (286–336)	—	—	430–480	—	238–271
CW/BW (%)	43 (40–46)	53–54	47–50	—	—	—
Nº espinhos	45	45	43–45	41–45	42–45	45
AOSL	45 ± 6,4 (38–54)	46 ± 2,8 (41–51)	45 ± 5,8 (38–55)	60–100	—	33–38
AASL	47 ± 4,5 (43–52)	48 ± 4,6 (41–55)	50 ± 5,3 (44–59)	74–115	—	—
LSL	41 ± 7,9 (31–56)	42 ± 4,7 (31–53)	39 ± 6,6 (29–52)	—	—	45
DSL _(ab)	—	43 ± 4,7 (32–53)	44 ± 3,6 (38–50)	74–88	—	—
DSL _(o)	—	40 ± 3,4 (31–45)	40 ± 6,9 (26–48)	81–95	—	38–41
OSL	92 ± 23 (71–121)	131 ± 14 (116–150)	—	170–200	130 (110–140)	55–71

OSW	123 ± 15 (100–136)	145 ± 20 (123–171)	90–120	140–150	120 (100–120)	88–112
VSL	541 ± 20 (514–564)	555 ± 137 (409–717)	460–620	560–590	350 (300–400)	242–329
VSW	476 ± 54 (414–543)	579 ± 121 (430–717)	400–570	470–500	350 (280–430)	242–333
OSW/VSW	1: 4 (3,3–5)	1: 3,9–5	1: 3,8–4,4	—	1: 2,5 (2,4–3,3)	1: 2,8–3,8
OL	194 ± 30 (164–236)	225 ± 19 (205–239)	130–230	530–570	90 (70–110)	604–807
OL (%)	5 (4–5)	4–5	4,3–6	—	—	—
PL	—	—	—	60–170	40 (30–60)	45–60
PHL	125 ± 10 (107–134)	126 ± 37 (89–184)	90–130	116–130	90 (80–110)	69–93
PHW	107 ± 10 (96–121)	94 ± 36 (61–137)	90–110	88–102	90 (60–120)	69–90
ATL	472 ± 57 (407–557)	576 ± 187 (389–819)	440–700	830–1350	380 (290–470)	290–413
ATW	277 ± 26 (250–307)	276 ± 61 (212–375)	250–350	215–385	330 (220–410)	174–244
PTL	540 ± 57 (450–621)	608 ± 239 (382–887)	530–730	830–1350	410 (320–630)	309–483
PTW	277 ± 18 (257–307)	250 ± 54 (191–321)	250–320	215–385	290 (220–380)	174–290
OVL	191 ± 45 (129–250)	205 ± 88 (116–320)	180–310	260–380	210 (150–270)	152–246
OVW	186 ± 21 (157–207)	230 ± 107 (116–375)	160–220	200–370	190 (160–230)	121–217
TEND (mm)	1,1 ± 209 (0,8–1,4)	—	—	—	—	0,8–1,2
TEND (%)	26 (18–35)	26–32	25	—	—	19–24
OVAR (mm)	0,7 ± 247 (0,4–0,9)	—	—	0,08–0,31	—	0,8–1,1
OVAR (%)	16 (11–20)	21–23	20–28	—	—	20–25
Ovos (L)	—	106 ± 3 (101–111)	93–121	94–103	79–105	82–97
Ovos (W)	—	67 ± 3 (63–75)	56–65	50–55	49–75	48–59

HI: hospedeiros intermediários; HD: hospedeiros definitivos; ^N: infecção natural; ^E: infecção experimental.

Valores em **negrito** foram calculados a partir de pranchas disponíveis nos artigos, exceto *E. exile* Pinto e Melo (2012), que foram calculados a partir dos próprios exemplares depositados na Coleção Taxonômica de Trematódeos da UFMG.

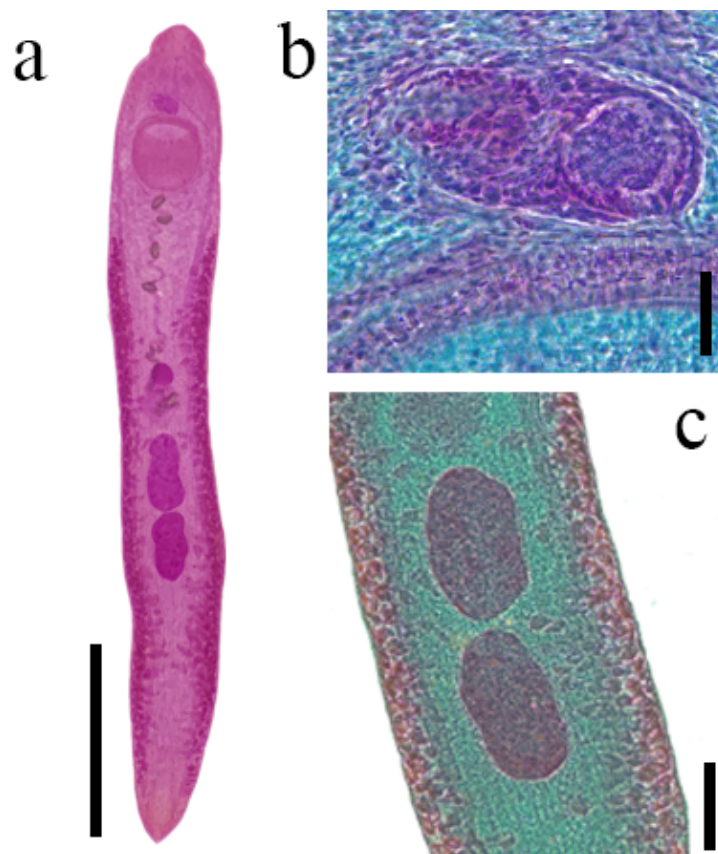


Figura 1. *Echinoparyphium exile* (Lutz, 1924) nov. comb. **a.** Parasito adulto obtido experimentalmente em *Meriones unguiculatus*, escala: 1 mm; **b.** Detalhe da bolsa do cirro, escala: 50 µm; **c.** Testículos alongados longitudinalmente, escala: 200 µm.

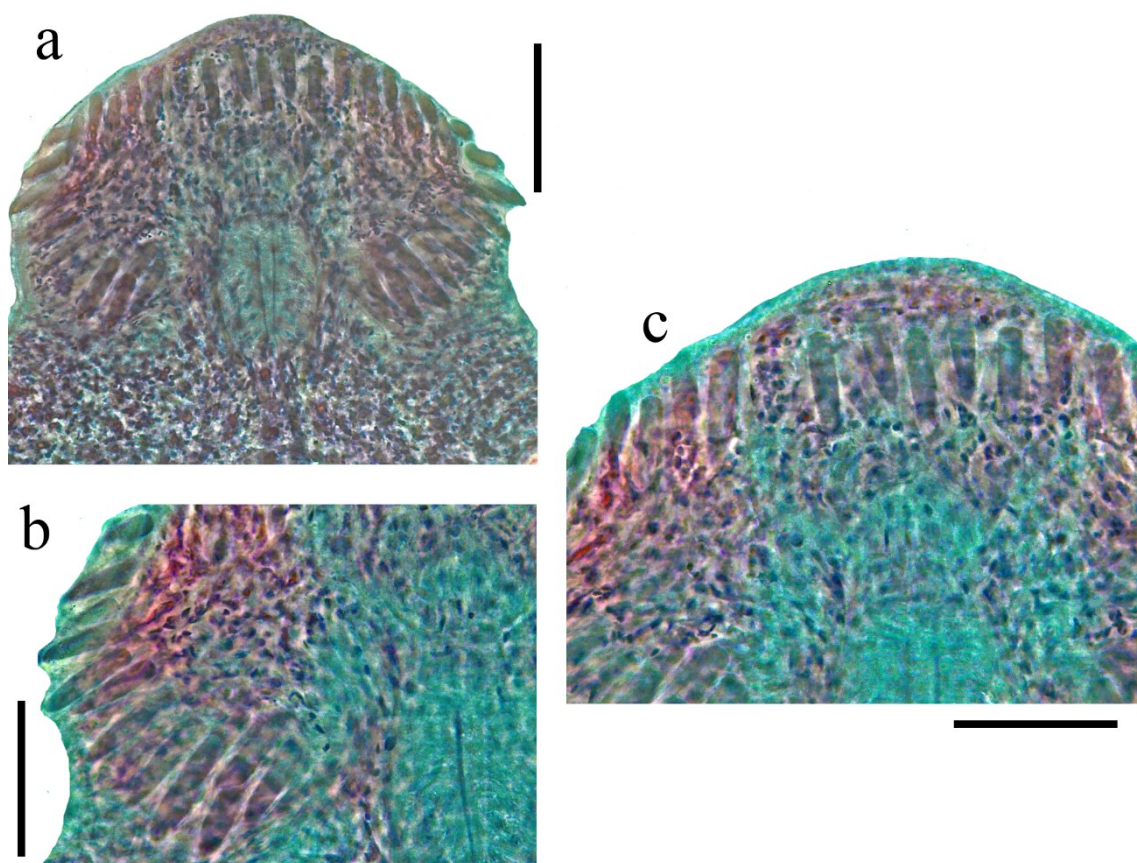


Figura 2. *Echinoparyphium exile* (Lutz, 1924) nov. comb. **a.** Colar cefálico contendo 45 espinhos, escala: 100 μm ; **b.** Detalhe dos espinhos angulares e laterais em dupla fileira, escala: 50 μm ; **c.** Detalhe dos espinhos dorsais com comprimentos subiguais, escala: 50 μm . Fotomicrografias obtidas usando a técnica de microscopia de contraste de fases.

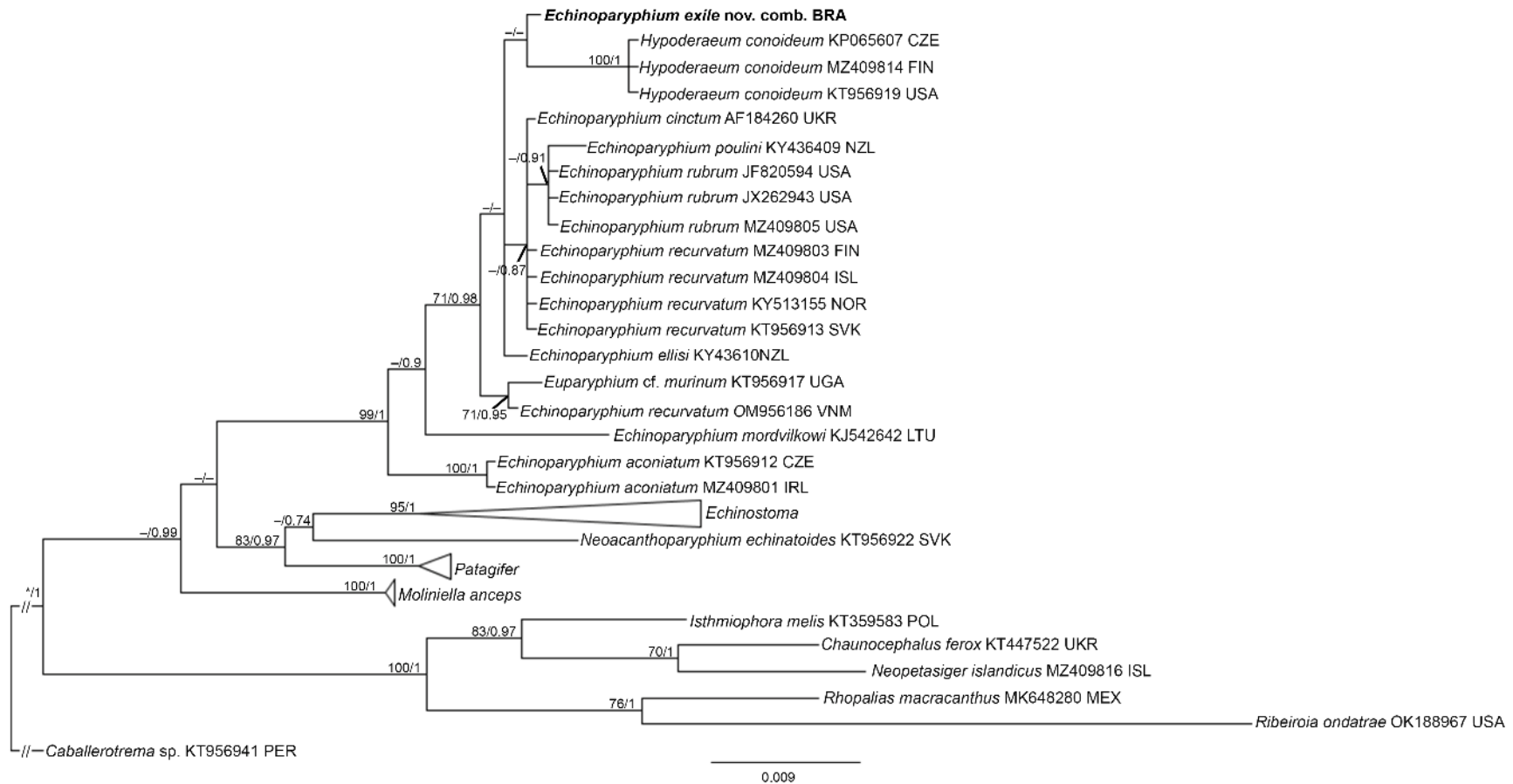


Figura 3 Relações filogenéticas entre *Echinoparyphium exile* nov. comb. (em negrito) e outras espécies de Echinostomatidae inferidas a partir de sequências de 28S rDNA (1055 pb; modelo de substituição nucleotídica: GTR + G + I), baseadas em análises de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB). O suporte nodal é indicado como MV/IB. Os valores <0,70 (IB) e <70 (MV) são indicados por um traço.

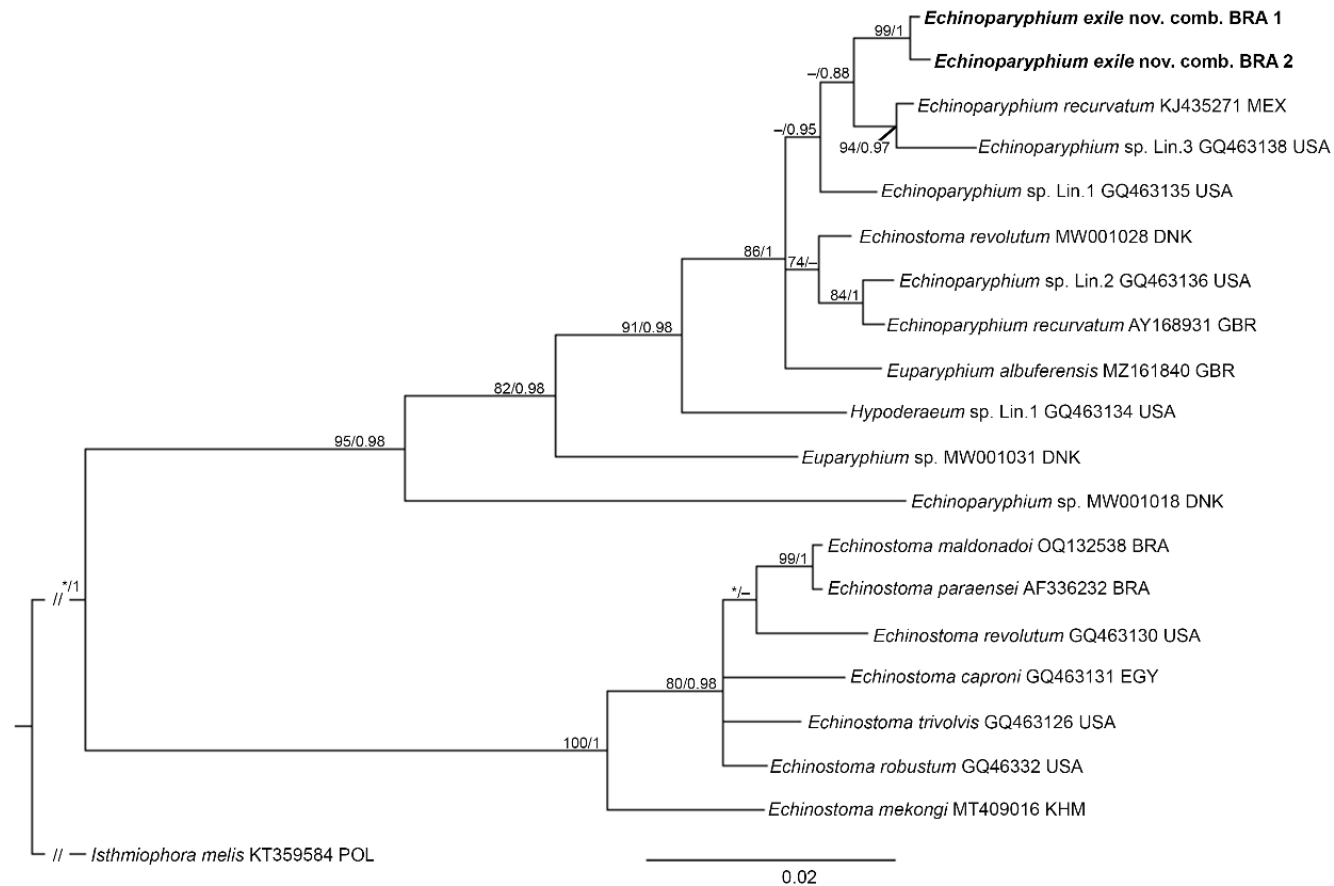


Figura 4 Relações filogenéticas entre *Echinoparyphium exile* nov. comb. (em negrito) e outras espécies de Echinostomatidae inferidas a partir de seqüências de ITS (1004 pb; modelo de substituição nucleotídica: K2 + G + I), baseadas em análises de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB). O suporte nodal é indicado como MV/IB. Os valores <0,70 (IB) e <70 (MV) são indicados por um traço.

CONCLUSÕES

O estudo taxonômico integrativo realizado em amostras de trematódeos do gênero *Echinostoma* oriundos de Minas Gerais, Brasil, resultaram nas seguintes conclusões:

- *Echinostoma pseudorobustum* foi descrita a partir de parasitos adultos encontrados em uma galinha caipira naturalmente infectada na cidade de Viçosa;
- *Echinostoma maldonadoi*, espécie morfológicamente semelhante a *E. paraensei*, foi descrita a partir da caracterização morfológica de parasitos adultos obtidos experimentalmente e reconstruções filogenéticas, sendo transmitida por *Stenophysa marmorata* em Alvorada de Minas;
- A posição filogenética de *Echinostoma nephrocystis* foi avaliada pela primeira vez a partir da análise de parasitos adultos obtidos experimentalmente de *Serinus canaria* e *Columba livia* infectados por metacercárias encontradas em moluscos de Belo Horizonte. A proximidade filogenética desta espécie com *Echinostoma caproni*, descrito na África, apontam para uma ancestralidade comum;
- O estudo molecular de *Echinostoma exile* realizado a partir de parasitos obtidos experimentalmente em roedores inoculados com metacercárias obtidas em moluscos de um lago urbano de Belo Horizonte demonstraram que essa espécie pertence ao gênero *Echinoparyphium*, sendo uma nova combinação e emenda na diagnose deste gênero proposta.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic Local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410, 1990. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- AVANCINI, L. F. **Helmintos e artrópodes de *Vanellus chilensis* (Molina, 1782), queroquero, da região sul do Rio Grande do Sul.** 2009. 58f. Dissertação (Mestrado) – Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2009. Disponível em: <https://docplayer.com.br/80802805-Universidade-federal-de-pelotas-programa-de-pos-graduacao-em-parasitologia.html>. Acesso em: 20/04/2020.
- BARBOSA, J. V. **Infecção natural e formas evolutivas de *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802) em *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Rattus norvegicus*. Susceptibilidade de *Mus musculus* ao parasitismo.** 1991. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1991. Disponível em: <https://tede.ufrirj.br/jspui/handle/jspui/4055>. Acesso em: 19/02/2021.
- BEAVER, P. C. **Experimental studies on *Echinostoma revolutum* (Fröelich) a fluke from birds and mammals.** Illinois Biological Monographs 15, 96 pp., 1937.
- BICKFORD, D. *et al.* Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, n. 4, p. 148–155, 2007. doi: 10.1016/j.tree.2006.11.004.
- BLASCO-COSTA, I. *et al.* Molecular approaches to trematode systematics: ‘best practice’ and implications for future study. **Systematic Parasitology**, v. 93, p. 295–306, 2016. doi: 10.1007/s11230-016-9631-2.
- BOWLES, J.; BLAIR, D.; McMANUS, P. A molecular phylogeny of the human schistosomes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 4: p. 103-109, 1995. doi: 10.1006/mpev.1995.1011.
- BRUM, J. G. W. Diversidade e potencial zoonótico de parasitos de *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (Marsupialia:Didelphidae). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 3, p. 335–336, 2018. doi: 10.22456/1679-9216.15012.
- CARVALHO, O. S.; KAWAZOE, U.; CUBA, C. A. C. *Echinostoma revolutum* (Fröelich, 1802) (Trematoda, Echinostomatidae) em pato doméstico de Minas Gerais. **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, v. 17, n. 2, p. 73–75, 1974.
- CHAI, J.Y. **Human Intestinal Flukes: from discovery to treatment and control.** 1^a ed. Dordrecht: Springer, 2019.
- CHAI, J. Y. *et al.* Taxonomy of *Echinostoma revolutum* and 37-collar-spined *Echinostoma* spp.: a historical review. **Korean Journal of Parasitology**, v. 58, n. 4, p. 343–371, 2020. doi: 10.3347/kjp.2020.58.4.343.
- COMBES, C. *et al.* Behaviours in trematode cercariae that enhance parasite transmission: patterns and processes. **Parasitology**, v. 109, 1994. doi: 10.1017/s0031182000085048.

CRIBB, T. H. *et al.* The Digenea. In: LITTLEWOOD, D. T. J.; BRAY, R. A. (eds.), **Interrelationships of the Platyhelminthes**. Londres: Taylor & Francis, p. 168–185, 2001.

DETWILER, J. T.; BOS, D. H.; MINCHELLA, D. J. Revealing the secret lives of cryptic species: Examining the phylogenetic relationships of echinostome parasites in North America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 611–620, 2010. doi: 10.1016/j.ympev.2010.01.004.

DIETZ, E. Die Echinostomiden der Vögel. **Zoologischer Anzeiger**, 34: 180–192, 1909.

DIETZ, E. Die Echinostomiden der Vögel. **Zoologische Jahrbücher**, 12: 265–512, 1910.

DRONEN, N. O. Re-evaluation of the species composition of *Bashkirovitrema* Skrjabin, 1944 (Digenea: Echinostomatidae), with the description of two new species of this genus and the proposal of *Kostadinovatrema novaeguiniense* n. g., n. sp. **Systematic Parasitology**, v. 74, p. 169–185, 2009. doi: 10.1007/s11230-009-9216-4.

ESTEBAN, J. G.; MUÑOZ-ANTOLI, C. Echinostomes: systematics and life cycles. In: FRIED, B.; TOLEDO, R. (eds.) **The Biology of Echinostomes: from the molecule to the community**. Nova Iorque: Springer, p. 1–34, 2009. doi: 10.1007/978-0-387-09577-6.

FALTÝNKOVÁ, A. *et al.* A re-assessment of species diversity within the ‘*revolutum*’ group of *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) in Europe. **Systematic Parasitology**, v. 90, p. 1–25, 2015. doi: 10.1007/s11230-014-9530-3.

FERNANDES, B. M. M. *et al.* **South American trematodes parasites of birds and mammals**. Rio de Janeiro: Oficina de Livros, 2015. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/media/south%20american%20trematodes%20parasites%20of%20amphibians%20and%20reptiles.pdf>. Acesso em: 04/12/2021.

FRIED, B.; HUFFMAN, J. E. The biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. **Advances in Parasitology**, v. 38, p. 311–368, 1996. doi:10.1016/s0065-308x(08)60037-8.

FRIED, B.; REDDY, A. Comparative studies on excystation and morphological features of the metacercariae of *Echinostoma paraensei* and *E. caproni*. **International Journal for Parasitology**, v. 27, p. 899–901, 1997. doi: 10.1016/s0020-7519(97)00058-1.

FRIED, B. Biology of echinostomes except *Echinostoma*. **Advances in Parasitology**, v. 9, p. 163–210, 2001. doi: 10.1016/s0065-308x(01)49040-3.

FRIED, B.; GRACZYK, T. K. Recent advances in the biology of *Echinostoma* species in the ‘*revolutum*’ group. **Advances in Parasitology**, v. 58, p. 139–195, 2004. doi: 10.1016/S0065-308X(04)58003-X.

FRIED, B.; GRACZYK, T. K. **Echinostomes as experimental models for biological research**. Dordrecht: Springer, 2000. doi: 10.1007/978-94-015-9606-0.

FRIED, B.; KANEV, I.; REDDY, A. Studies on collar spines of echinostomatid trematodes. **Parasitology Research**, v. 105, p. 605–608, 2009. doi: 10.1007/s00436-009-1519-5.

FRIED, B.; TOLEDO, R. **The Biology of Echinostomes: from the molecule to the community**. Nova Iorque: Springer, 333p., 2009.

FU, Y. T. *et al.* Characterization of the complete mitochondrial genome of the echinostome *Echinostoma miyagawai* and phylogenetic implications. **Parasitology Research**, v. 118, p. 3091–3097, 2019. doi: 10.1007/s00436-019-06417-4.

GALAKTIONOV, K. V.; DOBROVOLSKIJ, A. A. The trematode life cycle as a system of adaptations. *In*: FRIED, B.; GRACZYK, T. K. (eds.) **The biology and Evolution of Trematodes**. Dordrecht: Springer, 592pp., 2003.

GEORGIEVA, S.; BLASCO-COSTA, I.; KOSTADINOVA, A. Molecular characterization of four echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) from birds in New Zealand, with descriptions of *Echinostoma novaezealandense* n. sp. and *Echinoparyphium poulini* n. sp. **Systematic Parasitology**, v. 94, p. 477–497, 2017. doi: 10.1007/s11230-017-9712-x.

GEORGIEVA, S. *et al.* *Echinostoma 'revolutum'* (Digenea: Echinostomatidae) species complex revisited: species delimitation based on novel molecular and morphological data gathered in Europe. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 520, 2014. doi: 10.1186/s13071-014-0520-8.

GEORGIEVA, S. *et al.* New cryptic species of the 'revolutum' group of *Echinostoma* (Digenea: Echinostomatidae) revealed by molecular and morphological data. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 64, 2013. doi: 10.1186/1756-3305-6-64.

GOMES DE FARIA. *Echinostomum crotophagae*, n. sp.: a new parasite of the blue anú, *Crotophaga maior*. L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.1, n. 2, 1909. doi: 10.1590/S0074-02761909000200003.

GRACZYK, T. K.; FRIED, B. Echinostomiasis: a common but forgotten food-borne disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 501–504, 1998. doi: 10.4269/ajtmh.1998.58.501.

HAAS, W. The behavioral biology of echinostomes. *In*: FRIED, B.; GRACZYK, T. K. (eds.) **Echinostomes as experimental models for biological research**. Dordrecht: Springer, p. 175–198, 2000. doi: 10.1007/978-94-015-9606-0.

HAAS, W. *et al.* Snail-host-finding by miracidia and cercariae: chemical host cues. **Parasitology Today**, v. 11, p. 468–472, 1995. doi:10.1016/0169-4758(95)80066-2.

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

HUFFMAN, J. E.; FRIED, B. *Echinostoma* and Echinostomiasis. *In*: BAKER, J.R.; MULLER, R. (eds.) **Advances in Parasitology**. Estados Unidos: Academic Press, v. 29, p. 215–269, 1990. doi: 10.1016/S0065-308X(08)60107-4.

INTERNATIONAL HELMINTH GENOMES CONSORTIUM. Comparative genomics of the major parasitic worms. **Nature Genetics**, v. 51, p. 163–174, 2019. doi: 10.1038/s41588-018-0262-1.

IRWIN, S. W. B.; FRIED, B. Scanning and transmission electron microscopic observations on metacercariae of *Echinostoma trivolvis* and *Echinostoma caproni* during in vitro excystation. **Journal of Helminthology**, v. 57, p. 79–83, 1990.

KANEV, I. Life-cycle, delimitation and redescription of *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) (Trematoda: Echinostomatidae). **Systematic Parasitology**, v. 28, p. 125–144, 1994. doi: 10.1007/BF00009591

KANEV, I. *et al.* Redescription of *Echinostoma jurini* (Skvortzov, 1924) with a discussion of its identity and characteristics. **Annalen des Naturhistorischen**, v. 97B, p. 37–53, 1995b.

KANEV, I. *et al.* Redescription of *Echinostoma trivolvis* (Cort, 1914) (Trematoda, Echinostomatidae) with a discussion on its identity. **Systematic Parasitology**, v. 32, p. 61–70, 1995a. doi: 10.1007/BF00009468

KANEV, I.; FRIED, B.; RADEV, V. Collar spine models in the genus *Echinostoma* (Trematoda: Echinostomatidae). **Parasitology Research**, v. 105, n. 4, p. 921–927, 2009. doi: 10.1007/s00436-009-1475-0.

KANEV, I. *et al.* An overview of the biology of echinostomes. *In*: FRIED, B.; GRACZYK, T. K. (eds.) **Echinostomes as experimental models for biological research**. Dordrecht: Springer, p.1–29, 2000. doi: 10.1007/978-94-015-9606-0_1.

KEELER, S. P.; HUFFMAN, J. E. Echinostomes in the second intermediate host. *In*: TOLEDO, R.; FRIED, B. (eds) **The Biology of Echinostomes**. Nova Iorque: Springer, 2009. doi: 10.1007/978-0-387-09577-6_3.

KOHN, A.; BUHRNHEIN, V.; COSTA, H. M. Infestação natural de *Echinostoma revolutum* (FRÖELICH, 1802) (Trematoda, Echinostomatidae) em porco doméstico. **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, v. 16, n. 1, p. 5–6, 1972.

KOHN, A.; FERNANDES, B. M. M. Sobre as espécies do gênero *Echinostoma* Rudolphi, 1809 descritas por Adolpho Lutz em 1924. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 73, n. 1–2, 1975. doi: 10.1590/S0074-02761975000100006.

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

KOSTADINOVA, A.; GIBSON, D. I. The systematics of the echinostomes. *In*: FRIED, B.; GRACZYK, T. K. (eds.) **Echinostomes as experimental models for biological research**. Dordrecht: Springer, p. 31–52, 2000. doi: 10.1007/978-94-015-9606-0.

KOSTADINOVA, A. *et al.* A quantitative approach to the evaluation of the morphological variability of two echinostomes, *Echinostoma miyagawai* Ishii, 1932 and *E. revolutum* (Frölich, 1802), from Europe. **Systematic Parasitology**, v. 45, p. 1–15, 2000. doi: 10.1023/a:1006232612469.

KOSTADINOVA, A. *et al.* Phylogenetic relationships of *Echinostoma* Rudolphi, 1809 (Digenea: Echinostomatidae) and related genera re-assessed via DNA and morphological analyses. **Systematic Parasitology**, v. 54, p. 159–176, 2003. doi: 10.1023/a:1022681123340.

KOSTADINOVA, A.; PÉREZ-DEL-OLMO, A. The Systematics of the Trematoda. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1154, p. 21–42, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-18616-6_2.

KOSTADINOVA, A.; SKÍRNISSON, K. *Petasiger islandicus* n. sp. (Digenea: Echinostomatidae) in the horned grebe *Podiceps auritus* (L.) (Aves: Podicipedidae) from Iceland. **Systematic Parasitology**, v. 68, n. 3, p. 217–223, 2007. doi: 10.1007/s11230-007-9092-8.

KUMAR, S. *et al.* MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547–1549, 2018. doi: 10.1093/molbev/msy096.

LAIDEMITT, M. R. *et al.* The diverse echinostomes from East Africa: With a focus on species that use *Biomphalaria* and *Bulinus* as intermediate hosts. **Acta Tropica**, v. 193, p. 38–49, 2019. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.01.025.

LAJUS, D.; SUKHIKH, N.; ALEKSSEV, V. Cryptic or pseudocryptic: Can morphological methods inform copepod taxonomy? An analysis of publications and a case study of the *Eurytemora affinis* species complex. **Ecology and Evolution**, v. 5, p. 2374–2385, 2015. doi: 10.1002/ece3.1521.

LE, T. H. *et al.* Comparative mitogenomics of the zoonotic parasite *Echinostoma revolutum* resolves taxonomic relationships within the ‘*E. revolutum*’ species group and the Echinostomata (Platyhelminthes: Digenea). **Parasitology**, v. 147, p. 566–576, 2020. doi: 10.1017/S0031182020000128.

LELES, D. *et al.* Insights about echinostomiasis by paleomolecular diagnosis. **Parasitology International**, v. 63, p. 646–649, 2014. doi: 10.1016/j.parint.2014.04.005.

LEUNG, T. L. F.; KEENEY, D. B.; POULIN, R. Cryptic species complexes in manipulative echinostomatid trematodes: when two become six. **Parasitology**, v. 136, p. 241–252, 2009. doi: 10.1017/S0031182008005374.

LI, Y. *et al.* The complete mitochondrial genome of *Echinostoma miyagawai*: comparisons with closely related species and phylogenetic implications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 75, n. 103961, 2019. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103961.

LIE, K.J. Further studies on the life history of *Echinostoma lindoense* Sandground and Bonne, 1940 (Trematoda: Echinostomatidae) with a report of its occurrence in Brazil. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 35, p. 74–77, 1968.

LIE, K. J.; BASCH, P. F. Life history of *Echinostoma barbosai* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). **Journal of Parasitology**, v. 52, p. 1052–1057, 1966. doi: 10.2307/3276346.

LIE, K. J.; BASCH, P. F. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). **Journal of Parasitology**, v. 53, p. 1192–1199, 1967. doi: 10.2307/3276679.

LUTON, K.; WALKER, D.; BLAIR, D. Comparison of ribosomal internal transcribed spacer from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 56, p. 323–328, 1992. doi: 10.1016/0166-6851(92)90181-I.

LUTZ, A. Estudos sobre a evolução dos endotrematodes brasileiros. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 17, p. 55–57, 1924.

LUTZ, A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, p. 121–155, 1919.

MACHADO, V. L. L.; SAMPAIO, F. A. Desenvolvimento de *Echinostoma parcespinosum* LUTZ, 1924 em *Pomacea lineata* (SPIX, 1827). **Naturalia**, v. 5, p. 23–29, 1980.

MALDONADO JR, A. *et al.* Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) concurrently infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 96, p. 193–198, 2001c. doi: 10.1590/s0074-02762001000900030.

MALDONADO JR, A.; LANFREDI, R. M. Echinostomes in the wild. *In*: FRIED, B.; TOLEDO, R. (eds.) **The Biology of Echinostomes: from the molecule to the community**. Nova Iorque: Springer, p. 130–141, 2009. doi: 10.1007/978-0-387-09577-6.

MALDONADO JR, A. *et al.* Description of the adult worms of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. **Parasitology Research**, v. 87, p. 840–848, 2001a. doi: 10.1007/s004360100451.

MALDONADO JR, A. *et al.* Biological aspects of a new isolate of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae): susceptibility of sympatric snails and the natural vertebrate host. **Parasitology Research**, v. 87, p. 853–859, 2001b. doi: 10.1007/s004360100450.

MALDONADO JR, A. *et al.* Biological variation between two Brazilian geographical isolates of *Echinostoma paraensei*. **Journal of Helminthology**, v. 79, n. 4, p. 345–351, 2005. doi: 10.1079/joh2005293.

MALDONADO JR, A.; VIEIRA, G. O.; LANFREDI, R. M. *Echinostoma luisreyi* n. sp. (Platyhelminthes: Digenea) by light and scanning electron microscopy. **Journal of Parasitology**, v. 89, p. 800–808, 2003. doi: 10.1645/GE-3095.

MARCILLA, A. Echinostomes: genomics and proteomics. *In*: FRIED, B.; TOLEDO, R. (eds.) **The Biology of Echinostomes: from the molecule to the community**. Nova Iorque: Springer, p. 130–141, 2009. doi: 10.1007/978-0-387-09577-6.

MARCOGLIESE, D. J. Parasites of the superorganism: are they indicators of ecosystem health? **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 7, p. 705–716, 2005. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.01.015.

MELLO, A. Da ocorrência de *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) em *Gallus domesticus* L. no Brasil. **Archivos da Escola Superior de Agricultura e Medicina Veterinária**, v. 10 n. 2, p. 172, 1933.

MIAO, F. *et al.* First case of human echinostomiasis in the urinary bladder. **Journal of Travel Medicine**, v. 28, n. 6, 2021. doi:10.1093/jtm/taab091.

MIURA, O. *et al.* Molecular-genetic analyses reveal cryptic species of trematodes in the intertidal gastropod, *Batillaria cumingi* (Crosse). **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 793-801, 2005. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.02.014.

MORGAN, J. A. T.; BLAIR, D. Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group. **Parasitology**, v. 111, p. 609–615, 1995. doi: 10.1017/S003118200007709X.

MORGAN, J. A. T.; BLAIR, D. Molecular biology of echinostomes. *In*: FRIED, B.; TOLEDO, R. (eds.) **The Biology of Echinostomes: from the molecule to the community**. Nova Iorque: Springer, p. 245–266, 2000. doi: 10.1007/978-0-387-09577-6.

MORGAN, J.A.T.; BLAIR, D. Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacers and mitochondrial CO1 and ND1 genes for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda). **Parasitology**, v. 116, p. 289–297, 1998. doi: 10.1017/s0031182097002217.

MOSZCZYNSKA, A. *et al.* Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 75–82, 2009. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02634.

NADLER, S.; PÉREZ-PONCE de LEÓN, G. Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. **Parasitology**, v. 138, p. 1688–1709, 2011. doi: 10.1017/S003118201000168X.

NAKAO, M.; SASAKI, M. Trematode diversity in freshwater snails from a stopover point for migratory waterfowls in Hokkaido, Japan: An assessment by molecular phylogenetic and population genetic analyses. **Parasitology International**, v. 83, n. 102329, 2021. doi: 10.1016/j.parint.2021.102329.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NCBI) 2022. Disponível em: <https://www.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 18/07/2022.

OLSON, P. D. *et al.* Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 733–755, 2003. doi: 10.1016/s0020-7519(03)00049-3

PANTOJA, C. *et al.* Diversity of echinostomes (Digenea: Echinostomatidae) in their snail hosts at high latitudes. **Parasite**, v. 28, n. 59, 2021. doi: 10.1051/parasite/2021054.

PÉREZ-PONCE de LEÓN, G.; HERNÁNDEZ-MENA, D. I. Testing the higherlevel 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**, v. 93, p. 260–276, 2019. doi: 10.1017/S0022149X19000191.

PÉREZ-PONCE de LEÓN, G.; NADLER, S. A. What we don’t recognize can hurt us: A plea for awareness about cryptic species. **Journal of Parasitology**, v. 96, p. 453–464, 2010. doi:10.1645/GE-2260.1.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. Larvas de trematódeos em moluscos do Brasil: panorama e perspectivas após um século de estudos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, p. 369–386, 2013. doi: 10.5216/rpt.v42i4.27922.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. *Physa marmorata* (Molusca: Physidae) como hospedeiro intermediário de *Echinostoma exile* (Trematoda: Echinostomatidae) no Brasil. **Neotropical Helminthology**, v. 6, p. 291–299, 2012. doi: 10.24039/rnh2012621020.

PULLANDRE, N.; BROUILLET, S.; ACHAZ, G. ASAP: assemble species by automatic partitioning. **Molecular Ecology Resources**, v. 21, p. 609–620, 2021. doi: 10.1111/1755-0998.13281.

RAN, R. *et al.* Mitochondrial Genome Sequence of *Echinostoma revolutum* from Red-Crowned Crane (*Grus japonensis*). **Korean Journal of Parasitology**, v. 58, n. 1, p. 73–79, 2020. doi: 10.3347/kjp.2020.58.1.73

RONQUIST, F. *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539–542, 2012. doi: 10.1093/sysbio/sys029.

SERENO-URIBE, A. L. *et al.* Morphological and molecular analyses of larval and adult stages of *Echinoparyphium recurvatum* von Linstow 1873 (Digenea: Echinostomatidae) from central Mexico. **Journal of Helminthology**, v. 89, p. 458–464, 2015. doi: 10.1017/S0022149X14000297.

SIANTO, L. *et al.* Animal helminths in human archaeological remains: a review of zoonoses in the past. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 119–130, 2009. doi: 10.1590/S0036-46652009000300001.

SIANTO, L. *et al.* Helminths in feline coprolites up to 9000 years in the Brazilian Northeast. **Parasitology International**, v. 63, p. 851–857, 2016. doi: 10.1016/j.parint.2014.08.002.

SIANTO, L. *et al.* The finding of *Echinostoma* (Trematoda: Digenea) and hookworm eggs in coprolites collected from a Brazilian mummified body dated 600–1,200 years before present. **Journal of Parasitology**, v. 91, p. 972–975, 2005. doi: 10.1645/GE-3445RN.1.

SORENSEN, R. E.; CURTIS, J.; MINCHELLA, D. J. Intraspecific variation in the rDNA ITS loci of 37-collar-spined echinostomes from North America: implication for sequence-based diagnoses and phylogenetics. **Journal of Parasitology**, v. 84, p. 992–997, 1998.

THATCHER, V. E. **Trematódeos Neotropicais**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 553 pp, 1993.

TKACH, V. V.; KUDLAI, O.; KOSTADINOVA, A. Molecular phylogeny and systematics of the Echinostomatoidea Looss, 1899 (Platyhelminthes: Digenea). **International Journal for Parasitology**, v. 46, p. 1–15, 2016. doi: 10.1016/j.ijpara.2015.11.001.

TKACH, V. V. *et al.* Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). **Systematic Parasitology**, v. 56, p. 1–15, 2003. doi: 10.1023/A:1025546001611.

TOLEDO, R. *et al.* Neglected Food-Borne Trematodiasis: echinostomiasis and gastrodiscoidiasis. **Parasitology**, v. 28, p. 1–33, 2022. doi: 10.1017/S0031182022000385.

TOLEDO, R. *et al.* Intestinal Trematode Infections. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1154, p. 181–213, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-18616-6_7.

TOLEDO, R.; ESTEBAN, J. G. An update on human echinostomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 1, p. 37–45, 2016. doi: 10.1093/trstmh/trv099.

TOLEDO, R.; FRIED, B. Echinostomes as experimental models for interactions between adult parasites and vertebrate hosts. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 251–254, 2005. doi: 10.1016/j.pt.2005.04.006.

TOLEDO, R. *et al.* History of Echinostomes (Trematoda). **Acta Parasitologica**, v. 59, p. 553–565, 2014. doi: 10.2478/s11686-014-0302-7.

TOLEDO, R. Echinostomes in the definitive host: a model for the study of host-parasite relationships. *In*: FRIED, B.; TOLEDO, R. (eds.) **The Biology of Echinostomes: the molecule to the community**. Nova Iorque: Springer, 2009. doi: 10.1007/978-0-387-09577-6.

TOLEDO, R. *et al.* The comparative development of *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) adults in experimentally infected hamsters and rats. **Parasitology Research**, v. 93, p. 439–444, 2004. doi: 10.1007/s00436-004-1161-1.

TOLEDO, R.; MUÑOZ-ANTOLÍ, C.; FRIED, B. The use of echinostomes to study host-parasite relationships between larval trematodes and invertebrate and cold-blooded vertebrate hosts. **Parasitology Research**, v.100, p. 1177–1185, 2007. doi: 10.1007/s00436-007-0470-6.

TOLEDO, R. *et al.* Survival and infectivity of *Hypoderaeum conoideum* and *Euparyphium albuferensis* cercariae under laboratory conditions. **Journal of Helminthology**, v. 73, p. 177–182, 1999.

TOLEDO, R.; ESTEBAN, J. G.; FRIED, B. Recent advances in the biology of echinostomes. **Advances in Parasitology**, v. 69, cap. 3, p. 147–204, 2009. doi: 10.1016/S0065-308X(09)69003-5.

TRAVASSOS, L.; TEIXEIRA DE FREITAS, J. F.; KOHN, A. Encontro de *Echinostoma revolutum* (FROELICH, 1802) em falo de pato doméstico. **Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro**, v. 11, n. 6, p. 215–216, 1968.

TRAVASSOS, L.; TEIXEIRA DE FREITAS, J.F.; KOHN, A. Trematódeos do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, tomo 67, fascículo único, 1969.

VILAS, R.; CRISCIONE, C. D.; BLOUIN, M. S. A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. **Parasitology**, v. 131, p. 839–846, 2005. doi: 10.1017/S0031182005008437.

YAMAGUTI, S. **Systema Helminthum**, v. I, Digenetic Trematodes of Vertebrates, Part 1 e 2, Nova Iorque: Interscience Pub. Inc., 1958.

YAMAGUTI, S. **A synoptical review of life histories of digenetic trematodes of vertebrates with special reference to the morphology of their larval forms**. Tóquio: Keigaku Publishing, 1975.

YAMAGUTI, S. Studies on the helminth fauna of Japan. Part 5. Trematodes of birds, III. **Japanese Journal of Zoology**, v. 6, p. 159–182, 1935.

ZHANG, J. *et al.* A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, v. 29, p. 2869–2876, 2013. doi: 10.1093/bioinformatics/btt499.