

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

Eduardo Alberto Pulido Murillo

ESTUDO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE TREMATÓDEOS
TRANSMITIDOS POR *MELANOIDES TUBERCULATA* (MOLLUSCA:
THIARIDAE) EM COLEÇÕES AQUÁTICAS DO PERU

Belo Horizonte

2017

Eduardo Alberto Pulido Murillo

ESTUDO MORFOLÓGICO E MOLECULAR DE TREMATÓDEOS
TRANSMITIDOS POR *MELANOIDES TUBERCULATA* (MOLLUSCA:
THIARIDAE) EM COLEÇÕES AQUÁTICAS DO PERU

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

Área de concentração: Helminologia

Orientador: Prof. Dr. Hudson Alves Pinto

Belo Horizonte

2017

À minha família

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Miria Aurora Murillo Loayza e Esteban Eduardo Pulido Horna, por minha criação e por me oferecer uma boa formação, tanto humana quanto acadêmica, e também, pelo constante apoio e incentivo em cada tomada de decisão durante minha vida.

Às minhas irmãs Miriam Pulido Murillo, Melissa Pulido Murillo e Karen Pulido Murillo, que apesar da distância, sempre estiveram presentes, me apoiando e aconselhando, nos bons e nos maus momentos.

Ao professor Hudson Alves Pinto, meu orientador, pela oportunidade de realizar um estudo em uma área que eu conhecia pouco. Realmente foi uma aventura e fico contente de ter aprendido algo novo que será muito útil no meu futuro. Agradeço também a paciência, disponibilidade e incentivo durante essa trajetória.

Ao professor Alan Lane de Melo, pelos conselhos e apoio e por ter aberto as portas de seu laboratório para o desenvolvimento do projeto.

À professora Rosa Nérida Martínez Rojas, por ter fornecido diversos aparelhos de seu laboratório para a realização das etapas iniciais do projeto. Além disso, por ter sido a pessoa que me fez conhecer o imenso mundo da Parasitologia durante minha graduação e me incentivar a conhecer cada dia mais.

Ao professor Manuel Edmundo Tantaleán Vidaurre, pelas conversas sobre taxonomia de helmintos durante a realização do presente estudo, as quais me motivaram a conhecer mais essa área. Agradeço também pelo apoio em obter algumas referências bibliográficas que foram úteis.

Ao Sr. Airton Lobo, pela amizade e pela ajuda na preparação e montagem permanente dos parasitos encontrados no estudo e por me transmitir um pouco de sua grande experiência técnica.

À professora Élide Mara Leite Rabelo, pela ajuda e incentivo durante o desenvolvimento do estudo molecular, assim como pelas sugestões para se melhorar em cada uma das etapas realizadas.

Ao Me. Luis Fernando Viana Furtado, pela serenidade e no ensino das diferentes técnicas moleculares realizadas no presente estudo.

Ao Dr. Francisco Carlos Ferreira Júnior pela amizade e pela paciência em explicar sobre as etapas para a realização da edição de sequências moleculares e da análise filogenética.

À Sra. Ana Paula Oliveira Martins, uma pessoa muito agradável e atenta, que sempre me auxiliou, de forma eficiente no processo de comutação bibliográfica, permitindo a aquisição de trabalhos científicos importantes para o presente estudo.

Ao engenheiro Fernando Gil, chefe da *Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla*, por ter permitido a realização das coletas malacológicas do presente estudo neste ambiente natural. Sou grato também, ao biólogo Christian Carazas e demais trabalhadores da área, pela amabilidade e auxílio.

Ao Sr. Aldo Solimano Lopez Aliaga, Diretor Técnico do *Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa*, pelo interesse e incentivo às pesquisas desenvolvidas nessa área natural. Também, ao engenheiro José Junco por ter garantido o acesso a cada ponto de coleta.

Aos amigos do mestrado e do Departamento em Parasitologia. Em especial, à Jamila Aboobacar, uma grande amiga da qual sempre me lembrarei, por ter compartilhado com ela diversas experiências durante as aulas do curso. Agradeço também aos demais amigos, Letícia Estevam, Gabriela Bessa, Raquel Rodrigues, Wagner Rêgo, Agna Guimarães e Jennifer Ottino, pela boa convivência e por serem pessoas com quem posso contar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, ICB, UFMG, em nome do atual coordenador Professor Ricardo Toshio Fujiwara, pela oportunidade de ser discente deste departamento.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Parasitologia pelas excelentes aulas. Realmente foi uma grande experiência conhecer mais sobre o mundo dos parasitos.

Às Sras, Sumara Aparecida Guilherme e Sibeles das Graças Guilherme Abreu, secretárias da Pós-Graduação em Parasitologia pela atenção, constante ajuda e orientação, antes e depois de minha chegada ao Brasil.

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

RESUMO

Melanooides tuberculata (Müller, 1774) é um molusco aquático invasor na América do Sul, onde, nos últimos anos, vem sendo relatado como hospedeiro intermediário de algumas espécies de trematódeos. No Peru, apesar de a ocorrência de *M. tuberculata* ser conhecida há décadas, estudos sobre o envolvimento deste tiarídeo na transmissão de trematódeos são escassos. No presente estudo, coletas malacológicas foram realizadas em coleções aquáticas do litoral central do Peru, entre dezembro de 2015 e julho de 2016. Foram coletados e examinados 6.731 exemplares de *M. tuberculata*, dos quais 127 (1,9%) apresentavam-se infectados por quatro diferentes tipos cercarianos (Gimnocéfala, Megalura, Parapleurolofocerca e Pleurolofocerca). As cercárias obtidas foram utilizadas em estudos experimentais envolvendo, quando necessário, peixes (*Poecilia reticulata* Peters, 1859) como segundos hospedeiros intermediários, e aves (*Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758) e mamíferos (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) como hospedeiros definitivos. Os estágios evolutivos obtidos (cercárias, metacercárias e adultos) foram submetidos a estudo morfológico em microscópio de luz. Além disso, amostras dos parasitos foram utilizadas para a amplificação e sequenciamento de uma região do gene 18S rRNA, sendo as sequências obtidas comparadas com outras obtidas no GenBank e com amostras brasileiras destes trematódeos. A morfologia dos parasitos adultos obtidos experimentalmente, associada aos dados moleculares, possibilitaram a identificação de *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924), *Philophthalmus gralli* Mathis & Leger, 1910 e *Haplorchis pumilio* (Looss, 1896), espécies já relatadas infectando seres humanos na Ásia. Uma outra espécie, *Renicola* sp., foi identificada pelas características morfológicas das cercárias, contudo as sequências moleculares obtidas não forneceram informações taxonômicas adicionais. *Centrocestus formosanus*, *H. pumilio* e *Renicola* sp. são relatados pela primeira vez em *M. tuberculata* no Peru, ampliando a área de distribuição destas espécies na América do Sul. Além disso, a presença de *P. gralli* é confirmada nesse país, e as primeiras sequências moleculares de isolados sul-americanos foram obtidas para as outras três espécies de trematódeos.

Palavras-chave: *Melanooides tuberculata*, trematódeos, cercárias, biologia molecular, Peru.

ABSTRACT

Melanooides tuberculata (Müller, 1774) is an invasive aquatic snail in South America, where, in recent years, it has been reported as an intermediate host of some species of trematodes. In Peru, despite the occurrence of *M. tuberculata* be known for several decades, studies on the involvement of this thiarid in the transmission of trematodes are scarce. In the present study, a malacological survey was carried out, in two waterbodies located in the central coast of Peru, between December 2015 and July 2016. It was collected and examined 6,731 specimens of *M. tuberculata*, of which 127 (1.9%) were found infected with four different cercarian types (Gymnocephalous, Megalurous, Parapleurolophocercous and Pleurolophocercous). Cercariae were used in experimental studies involving, where appropriate, fishes (*Poecilia reticulata* Peters, 1859) as second intermediate hosts, and chickens (*Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758) and rodents (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) as definitive hosts. The developmental stages obtained (cercariae, metacercariae and adults) were used for morphological study by light microscopy. In addition, samples of parasites were subjected to amplification and sequencing of a region of the 18S rRNA gene. The sequences obtained were compared with other from GenBank as well as sequences obtained from Brazilian samples of these trematodes. The morphology of the adult parasites obtained experimentally and the molecular data allowed the identification of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924), *Philophthalmus gralli* Mathis & Leger, 1910 and *Haplorchis pumilio* (Looss, 1896), species already reported infecting humans in Asia. *Renicola* sp. was also identified by morphological traits of cercariae, however molecular sequences did not provide additional taxonomic information. *Centrocestus formosanus*, *H. pumilio* and *Renicola* sp. are reported for the first time in *M. tuberculata* from Peru, expanding the occurrence area of these species in South America. Moreover, it is confirmed the presence of *P. gralli* in that country, and the first molecular sequences for South American isolates of the other three species of trematodes were obtained.

Keywords: *Melanooides tuberculata*, trematodes, cercariae, molecular biology, Peru.

RESUMEN

Melanooides tuberculata (Müller, 1774) es un molusco acuático invasor en América del Sur, que en los últimos años viene siendo reportado como hospedero intermediario de algunas especies de trematodos. En el Perú, a pesar de que la ocurrencia de *M. tuberculata* es conocida hace unas décadas, estudios sobre la participación de este molusco en la transmisión de trematodos son escasos. En el presente estudio, se realizaron colectas en áreas acuáticas naturales localizadas en el litoral central del Perú, malacológicas entre diciembre del 2015 y julio de 2016. Fueron colectados y examinados un total de 6731 ejemplares de *M. tuberculata*, de los cuales 127 (1,9%) se encontraron infectados por cuatro diferentes tipos de cercarias (Gimnocéfala, Megalura, Parapleurolofocerca y Pleurolofocerca). Las formas larvales obtenidas fueron utilizadas en estudios experimentales considerando, cuando necesario, peces (*Poecilia reticulata* Peters, 1859) como segundos hospederos intermediarios; y aves (*Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758) y mamíferos (*Mus musculus* Linnaeus, 1758), como hospederos definitivos. Los estadios evolutivos obtenidos (cercarias, metacercarias y adultos) fueron sometidos a estudio morfológico en microscopio de luz. Adicionalmente, muestras de los parásitos fueron utilizados para la amplificación e secuenciación de una región del gen 18S rRNA. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con otras disponibles en el GenBank, y también con secuencias de muestras brasileñas de estos trematodos. La morfología de los parásitos adultos obtenidos experimentalmente, asociada con los datos moleculares, permitieron la identificación de *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924), *Philophthalmus gralli* Mathis & Leger, 1910 y *Haplorchis pumilio* (Looss, 1896), especies ya descritas infectando al hombre en Asia. Otra especie, *Renicola* sp., fue identificada por las características morfológicas de las cercarias; sin embargo, las secuencias moleculares obtenidas no ofrecieron informaciones taxonómicas adicionales. *Centrocestus formosanus*, *H. pumilio* e *Renicola* sp., son registradas por primera vez en *M. tuberculata* en el Perú, ampliando el área de distribución de estas especies en América del Sur. Además, la presencia de *P. gralli* es confirmada para ese país, y las primeras secuencias moleculares de los aislados sudamericanos fueron obtenidos para las otras tres especies de trematodos.

Palabras-clave: *Melanooides tuberculata*, trematodos, cercarias, biología molecular, Perú.

LISTAS DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Vista aérea da *Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla*, Peru, indicando as estações de coletas de moluscos realizadas em dezembro de 2015 e janeiro e julho de 2016.....29
- FIGURA 2 - Vista panorâmica das estações de coleta na *Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla*, Peru.....30
- FIGURA 3 - Vista área do *Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa*, Peru, com a localização das estações de coletas realizadas em janeiro e junho de 2016.....33
- FIGURA 4 - Vista panorâmica das estações de coleta no *Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa*, Peru.....34
- FIGURA 5 - Exemplos de *Melanoides tuberculata* coletados durante dezembro de 2015 e janeiro, junho e julho de 2016 nas áreas naturais localizadas no litoral central do Peru e respectivos percentuais da infecção por larvas de trematódeos.45
- FIGURA 6 - *Centrocestus formosanus* - Cercária do tipo Pleurolofocerca emergida de exemplares de *Melanoides tuberculata* coletados na *Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla* e no *Refugio Silvestre Pantanos de Villa*, Peru.50
- FIGURA 7 - *Centrocestus formosanus* – metacercárias recuperadas de exemplares de *Poecilia reticulata* infectados experimentalmente com cercárias do tipo Pleurolofocerca emergidas de *Melanoides tuberculata* oriundos do *Refugio Silvestre Pantanos de Villa*, Peru.....51
- FIGURA 8 - *Centrocestus formosanus* – Adulto recuperado do terço proximal do intestino delgado de camundongos, 7 dias após a infecção com metacercárias obtidas experimentalmente em *Poecilia reticulata* infectados por cercárias do tipo

Pleurolofocerca emergidas de exemplares de <i>Melanoides tuberculata</i> coletados no Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa, Peru..	52
FIGURA 9 - <i>Haplorchis pumilio</i> – Cercárias do tipo Parapleurolofocerca emergidas de exemplares de <i>Melanoides tuberculata</i> coletados no Refugio Silvestre Pantanos de Villa, Peru.	57
FIGURA 10 - <i>Haplorchis pumilio</i> – Metacercárias recuperadas de <i>Poecilia reticulata</i> experimentalmente infectado por cercárias emergidas de exemplares de <i>Melanoides tuberculata</i> coletados no Refugio Silvestre Pantanos de Villa, Peru.	58
FIGURA 11 - <i>Haplorchis pumilio</i> – Adulto recuperado do terço distal do intestino delgado de <i>Mus musculus</i> , após 7 dias de infecção com metacercárias obtidas de exemplares de <i>Poecilia reticulata</i> experimentalmente infectados com cercárias emergidas de espécimes de <i>Melanoides tuberculata</i> coletados no Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa, Peru.	59
FIGURA 12 - <i>Philophthalmus gralli</i> – Cercárias do tipo Megalura emergidas de exemplares de <i>Melanoides tuberculata</i> coletados na Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla e no Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa.	63
FIGURA 13 - <i>Philophthalmus gralli</i> – (a) Metacercária encistada na superfície de uma lâmina de vidro em que foi adicionada cercária do tipo Megalura emergida de <i>Melanoides tuberculata</i> coletado no Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa, Peru.	64
FIGURA 14 - <i>Philophthalmus gralli</i> – Forma adulta recuperada da membrana nictitante de <i>Gallus gallus domesticus</i> 35 dias após infecção com metacercárias obtidas a partir de cercárias do tipo Megalura emergidas de exemplares de <i>Melanoides tuberculata</i> coletados no Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa.	65

FIGURA 15 - *Renicola* sp. – Cercária do tipo Gimnocéfala emergida de exemplares de *Melanoides tuberculata* coletados na *Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla* e no *Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa*.68

FIGURA 16 - Árvore filogenética demonstrando a relação entre sequências do gene nuclear 18S rRNA dos parasitos encontrados no presente estudo, de material proveniente de *Melanoides tuberculata* da *Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla* e no *Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa* (Lima, Peru), com sequências depositadas no GenBank.....72

LISTAS DE TABELAS

- TABELA 1 – Informações sobre as sequências parciais do gene 18S rRNA de trematódeos das famílias Heterophyidae, Philophthalmidae e Rencolidae depositadas no GenBank, utilizadas na construção da árvore filogenética43
- TABELA 2 - Exemplares de *Melanoides tuberculata* coletados e a taxa de infecção por tipos cercarianos em cada uma das 20 coletas malacológicas realizadas nas estações de coleta selecionadas nas duas áreas naturais localizadas no litoral central do Peru, durante os meses de dezembro de 2015 e janeiro, junho e julho de 2016.....46
- TABELA 3 - Dados morfométricos de forma adulta de *Centrocestus formosanus* obtidos no presente trabalho e medidas obtidas descritas por diferentes autores.53
- TABELA 4 - Dados morfométricos de forma adulta de *Haplorchis* spp. transmitidos por *Melanoides tuberculata* registrados por diferentes autores 60
- TABELA 5 - Dados morfométricos de adultos de *Philophthalmus gralli* obtidos no presente estudo e de outros registros de *Philophthalmus* spp. na América do Sul. 66
- TABELA 6 - Dados morfométricos de cercárias de *Rencicola* sp. emergidas de exemplares de *Melanoides tuberculata* coletados no *Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa* comparados com medidas de larvas semelhantes relatadas também neste tiarídeo por diferentes autores. 69
- TABELA 7 - Comparação pareada (distância p não corrigida expressa em percentagem) de região parcial do gene 18S rRNA entre espécies de trematódeos encontradas em *Melanoides tuberculata* no Peru e amostras de espécies relacionadas disponíveis no GenBank.....73

LISTAS DE ABREVIATURAS

C: Comprimento	O: Ovo
Ca: Cauda	Ov: Ovário
Cv: Complexo ventrogenital	pb: pares de base
d: Diâmetro	PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
DNA: Ácido desoxirribonucleico	PEG: Polietilen glicol
DPI: Dias pós-infecção	PA: Parapleurolofocerca
E: Esôfago	PL: Pleurolofocerca
EUA: Estados Unidos da América	rpm: rotações por minutos
Fa: Faringe	rRNA 18S: Ácido ribonucleico ribossomal da subunidade 18
GI: Gimnocéfala	S: Sverberg
INRENA: <i>Instituto Nacional de Recursos Naturales</i>	SERNANP: <i>Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado</i>
ITS: Espaços Transcritos Internos	T: Testículo
L: Largura	Ta: Testículo anterior
ML: <i>Maximum Likelihood</i>	Td: Testículo direito
MEGA: <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>	Te: Testículo esquerdo
Me: Megalura	Tp: Testículo posterior
min: minuto	Vo: Ventosa oral
mL: mililitro	Vv: Ventosa ventral
N: número	μL : Microlitro
ND: não determinado	μm: Micrômetro
nm: nanômetro	μM: Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 <i>Melanoides tuberculata</i> (Müller, 1774): biologia.....	17
1.2 Transmissão de trematódeos por <i>M. tuberculata</i>	18
1.3 Trematódeos invasores transmitidos por <i>M. tuberculata</i> nas Américas.....	19
1.4 Identificação de larvas de trematódeos: morfologia e biologia molecular.....	21
1.5 Transmissão de trematódeos por moluscos dulciaquícolas no Peru.....	23
2 JUSTIFICATIVA.....	25
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Área de estudo.....	27
4.1.1 <i>Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla</i>	27
4.1.2 <i>Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa</i>	31
4.2 Coletas de moluscos.....	35
4.3 Avaliação da infecção dos moluscos por larvas de trematódeos.....	35
4.4 Estudos experimentais.....	36
4.4.1 Obtenção de metacercárias.....	36
4.4.2 Infecção experimental de hospedeiros definitivos.....	37
4.4.3 Exame parasitológico.....	37
4.4.4 Recuperação de parasitos adultos.....	38
4.4.5 Comitê de ética.....	38
4.5 Estudo taxonômico dos estágios evolutivos.....	38
4.6 Caracterização molecular.....	39
4.6.1 Fixação dos estágios evolutivos.....	39
4.6.2 Extração e quantificação do DNA.....	40
4.6.3 Amplificação de DNA.....	40
4.6.4 Purificação dos produtos de PCR.....	41
4.6.5 Sequenciamento de DNA.....	41
4.6.6 Análises das sequências.....	41
5 RESULTADOS.....	44

5.1 Coletas de moluscos e avaliação da infecção por larvas de trematódeos	44
5.2 Estudos experimentais e taxonômicos	47
5.2.1 <i>Centrocestus formosanus</i>	47
5.2.2 <i>Haplorchis pumilio</i>	54
5.2.3 <i>Philophthalmus gralli</i>	61
5.2.4. <i>Renicola</i> sp.	67
5.3 Análise molecular	70
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÃO.....	81
8 REFERÊNCIAS	82
9 ANEXO	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774): biologia

Melanoides tuberculata é um gastrópode de água doce pertencente à família Thiaridae, nativo da África e Ásia (Facon *et al.*, 2003). Atualmente apresenta uma ampla distribuição geográfica, uma vez que foi introduzido em diferentes partes do mundo, possivelmente, pelo comércio de plantas aquáticas ornamentais procedentes do continente asiático (Madsen & Frandsen, 1989). É uma espécie ovovivípara e se reproduz principalmente por partenogênese, mas a reprodução sexual também tem sido descrita (Heller & Farstay, 1989; Ben-Ami & Heller, 2007). Habita uma ampla variedade de ambientes aquáticos, tanto léticos quanto lóticos, podendo ser encontrado em até 4 metros de profundidade em coleções aquáticas com pouca correnteza (Vasconcelos *et al.*, 2009), e está associado a diferentes tipos de substratos naturais ou introduzido pelo homem, como o plástico (Silva *et al.*, 1994). É capaz de tolerar baixos níveis de oxigênio, com moderado teor de salinidade (Bolaji *et al.*, 2011), e é altamente resistente a ambientes poluídos (Weir & Salice, 2012). Para o desenvolvimento, o molusco prefere coleções aquáticas com temperatura entre 18 a 32°C e a alimentação consiste principalmente de algas, bactérias, partículas orgânicas depositadas no sedimento e de plantas em decomposição (Vogler *et al.*, 2012).

Devido à reprodução partenogenética e a adaptação a diferentes condições ambientais, *M. tuberculata* atinge altos níveis de densidades populacionais, sendo reconhecido como uma espécie invasora (Dudgeon, 1986). Além disso, alguns estudos verificaram que a presença de *M. tuberculata* pode levar a uma redução significativa ou até mesmo à eliminação de populações de moluscos planorbídeos, e por isso estes tiarídeos foram propostos como possíveis controladores biológicos de moluscos do gênero *Biomphalaria* Preston, 1910, os vetores do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, agente etiológico da esquistossomose mansoni (Pointier & McCullough, 1989; Pointier, 1993, 2001; Guimarães *et al.*, 2001). Sem dúvida, é um método barato que tem mostrado bons resultados, mas a efetividade do tiarídeo sobre outros, dependerá estritamente dos fatores abióticos do habitat (Pointier & Giboda, 1999; Pointier & Jourdane, 2000; Giovanelli *et al.*, 2005a). Porém, apesar desse efeito positivo, o uso de *M. tuberculata* como controlador deve ser tratado com cuidado, devido a

possíveis impactos sobre outros moluscos nativos e também pela introdução de outras doenças parasitárias que poderiam afetar à fauna de uma determinada área, ou até ao mesmo homem (Pointier, 2001; Giovanelli *et al.*, 2005b).

1.2 Transmissão de trematódeos por *M. tuberculata*

Sabe-se que *M. tuberculata* é responsável da transmissão de 37 espécies de trematódeos, das quais 11 são consideradas zoonóticas, principalmente no continente asiático, sendo essas últimas as seguintes: *Echinochasmus japonicus* (Tanabe, 1926), *Centrocestus caninus* (Leiper, 1913), *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924), *Haplorchis pumilio* (Looss, 1896), *Haplorchis taichui* (Nishigori, 1924), *Haplorchis yokogawai* (Katsuta, 1932), *Heterophyes heterophyes* (Seibold, 1852), *Stellantchasmus falcatus* (Onji & Nishio, 1915), *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875), *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) e *Philophthalmus gralli* Mathis & Leger, 1910 (Pinto & Melo, 2011). Destes, *P. westermani* (parasito pulmonar) e *C. sinensis* (parasito hepático), têm um grande impacto na saúde pública na Ásia, onde se estima que 195 e 601 milhões de pessoas, respectivamente, estão em risco de adquirir estas parasitoses e mais de 50 milhões estão infectadas por algum destes parasitos (Keiser & Utzinger, 2009).

No entanto, não só os estágios adultos dos trematódeos podem afetar o homem. Recentemente, durante uma investigação de um surto de lesões oculares em crianças e jovens na Índia, verificou-se a presença de granulomas oculares causados por cercárias de *Procerovum varium* (Onji & Nishio, 1916), espécie transmitida por *M. tuberculata* (Arya *et al.*, 2016). Além disso, Karamian *et al.* (2011), detectaram no Irã, a participação do molusco na transmissão de parasitos de aves pertencentes à família Schistosomatidae. Mais recentemente, Schuster *et al.* (2014) elucidaram o ciclo biológico e descreveram uma nova espécie de esquistosomatídeo de ave, *Gigantobilharzia melanoidis* Schuster, Aldhoun & O'Donovan, 2014, espécie transmitida por *M. tuberculata* nos Emirados Árabes Unidos. Estes últimos parasitos são considerados potenciais agentes etiológicos de dermatite cercariana em humanos (Schuster *et al.*, 2014), uma doença considerada emergente (Horák *et al.*, 2015).

1.3 Trematódeos invasores transmitidos por *M. tuberculata* nas Américas

Até o momento, quatro espécies de trematódeos foram detectadas em *M. tuberculata* no continente americano: *C. formosanus*, *H. pumilio*, *P. gralli* e *Renicola* sp. (Pinto & Melo, 2011).

Centrocestus formosanus é um parasito intestinal de aves e mamíferos, representante da família Heterophyidae, que foi descrito por Nishigori (1924) a partir de formas adultas recuperadas em *Nycticorax nycticorax* Linnaeus, 1758 (Aves: Ardeidae) em Taiwan, à época, Formosa. Morfologicamente, diferencia-se de outras espécies do gênero por apresentar 32 espinhos aciculares ao redor da ventosa oral e pela vesícula excretora que é em forma de 'X'. O padrão do ciclo de vida do parasito é complexo, sendo necessária participação, além da participação do molusco tiarídeo como primeiro hospedeiro intermediário, peixes atuam como segundos hospedeiros intermediários; nas brânquias destes se desenvolvem a metacercária, forma infectiva do parasito (Chen, 1942, 1948).

O primeiro registro de *C. formosanus* nas Américas foi realizado por Martin (1958) no Havaí. Este autor detectou a emergência de cercárias do tipo Pleurolofocerca em um molusco identificado como *Stenomelania newcombi* e realizou estudos experimentais que permitiram a identificação do parasito. Segundo Tolley-Jordan & Chadwick (2012), a identificação de *Stenomelania newcombi* realizada por Martin (1958) foi equivocada, e muito provavelmente corresponde a *M. tuberculata*. Posteriormente, a transmissão de *C. formosanus* por *M. tuberculata* foi relatada no México (Arizmendi-Espinosa, 1992; Salgado-Maldonado *et al.*, 1995), Venezuela (Hernández *et al.*, 2003), Colômbia (Velásquez *et al.*, 2006), Costa Rica (Arguedas-Cortés *et al.*, 2010) e no Brasil (Pinto & Melo; 2010a; Paula-Andrade *et al.*, 2012; Ximenes *et al.*, 2016). Casos humanos de centrocestose ainda não foram descritos nesse continente, sendo mais frequentes na Ásia devido ao consumo de pratos preparados com peixe cru (Chen *et al.*, 1991; Li *et al.*, 2010; Chai *et al.*, 2013). Entretanto a possibilidade de ocorrência de futuros casos humanos desta zoonose na América, não deve ser descartada (Scholz & Salgado-Maldonado, 2000).

Outro heterofídeo transmitido por este tiarídeo é *H. pumilio*, encontrado pela primeira vez em *Pelecanus onocrotalus* Linnaeus, 1758 (Aves: Pelecanidae) e *Milvus migrans* Boddaert, 1783 (Aves: Accipitridae) do Egito, e denominado inicialmente como *Monostomum pumilio* por Looss, 1896 (citado por Pearson, 1964). É um enteroparasito de aves e mamíferos

(entre eles o homem), que também precisa de peixes no ciclo biológico. No continente americano, Scholz *et al.* (2000) registraram pela primeira vez para o México a transmissão de cercária do tipo Parapleurolofocerca por *M. tuberculata* e estudos experimentais demonstraram que está cercária corresponde à larva de *H. pumilio*. Díaz *et al.* (2008) descreveram o ciclo biológico de *H. pumilio* na Venezuela, reportando também o peixe *Rivulus hartii* (Boulenger, 1890) como hospedeiro intermediário, e *Butorides striata* Linnaeus, 1758 (Aves: Ardeidae) como hospedeiro definitivo. Relatos deste heterofídeo em *M. tuberculata* para esse continente foram também realizados nos Estados Unidos (Tolley-Jordan & Owen, 2008; Huston *et al.*, 2014).

Ressalta-se que o envolvimento de peixes nos ciclos de ambos os heterofídeos mencionados anteriormente, além de ter um impacto na saúde pública, podem afetar à piscicultura ou causar danos à biodiversidade. No caso de *C. formosanus*, a cercária emergida do molusco, encista-se nos filamentos dos arcos branquiais dos peixes (Madhavi, 1986; Mitchell *et al.*, 2000, 2002). É assim que a metacercária é frequentemente achada em peixes de água doce, muitas vezes com elevada carga parasitária, causando problemas respiratórios e levando à morte por asfixia (Scholz & Salgado-Maldonado, 2000; Mitchell *et al.*, 2005; Ortega *et al.*, 2009, Arguedas-Cortés *et al.*, 2010; Pinto & Melo, 2012a). Por outro lado, a metacercária de *H. pumilio*, encontra-se encistada na musculatura e base das aletas dos peixes. Segundo infecções experimentais realizadas por Sommerville (1982), uma quantidade elevada de cercárias pode ser letal em exemplares de ‘tilapia’ *Oreochromis spilurus* (Günther, 1894) devido à migração e dano que causa a larva no sistema da linha lateral, resultando também em mudanças no comportamento dos peixes, como nado errático e perda de equilíbrio.

Philophthalmus gralli, outro helminto transmitido por *M. tuberculata*, é um parasito ocular de aves, cuja primeira descrição foi realizada por Mathis & Leger (1910), quem encontraram as formas adultas no saco conjuntivo em *Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758 oriundos de Vietnã (citado por Nollen & Kanev, 1995). Em relação ao ciclo de vida, as cercárias (do tipo Megalura), após emergirem, se encistam rapidamente formando a metacercária em substratos sólidos ou até na mesma concha do molusco (Neal & Poulin, 2012). A infecção do hospedeiro definitivo ocorre pela ingestão de metacercárias ou contato direto das cercárias com o olho (quanto em contato com a água) (Mukaratirwa *et al.*, 2005). Nas Américas, a ocorrência do parasito em *M. tuberculata* foi descrita nos Estados Unidos (Murray & Haynes, 1969), México (Scholz *et al.*, 2000), Brasil (Pinto & Melo, 2010b), Peru (Literák *et al.*, 2013), Venezuela (Díaz *et al.*, 2002) e na Costa Rica (Rojas *et al.*, 2013;

Heneberg *et al.*, 2014). Em aves, natural e experimentalmente infectadas, foram observadas lacrimação e conjuntivite, criando um acesso para possíveis infecções secundárias (Verocai *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2013). A filoftalmose humana foi descrita nos Estados Unidos por Gutierrez *et al.* (1987), presuntivamente causada por *P. gralli*, mas a identificação definitiva dos adultos recuperados não foi possível por problemas de fixação.

O quarto trematódeo transmitido por *M. tuberculata* no continente americano pertence ao gênero *Renicola* (Digenea: Renicolidae), parasito renal de aves com ampla distribuição mundial. O ciclo biológico deste parasito envolve a participação de peixes como segundos hospedeiros intermediários. A cercária do parasito é do tipo Gimnocéfala, caracteriza-se pela ausência de estilete na ventosa oral, cauda simples e vesícula excretora em Y e foi relatado no Brasil por Pinto & Melo (2012b). Além disso, estes autores encontraram metacercárias destes parasitos no fígado de exemplares de *Poecilia reticulata* (Peters, 1859) naturalmente e experimentalmente infectados. Cercárias semelhantes foram descritas também em *M. tuberculata* na Venezuela (*Cercaria marinoi*) e na Colômbia (*Cercaria* sp. I) (Vergara & Velásquez, 2009). A forma adulta desta espécie transmitida por *M. tuberculata* não são ainda conhecidos.

1.4 Identificação de larvas de trematódeos: morfologia e biologia molecular

A identificação de trematódeos até os níveis taxonômicos mais inferiores é baseada tradicionalmente na morfologia dos adultos (Olson & Tkach, 2005; Littlewood, 2008; Van Steenkiste *et al.*, 2015; Faltýnková *et al.*, 2016). Porém, algumas dificuldades podem surgir devido ao tamanho do parasito, fragilidade do corpo, escassez de características taxonômicas e pelas variações fenotípicas induzidas pelo hospedeiro (Moszczyńska *et al.*, 2009; Poulin, 2009). A situação é ainda mais complicada no momento de se identificar os estágios larvais destes platelmintos, como os tipos cercarianos, os quais são morfologicamente diferentes dos adultos, sendo identificadas frequentemente até o nível de família ou superfamília (Dawes, 1946; Pinto & Melo, 2013a; Kudlai *et al.*, 2015). No entanto, a identificação das larvas pode ser mais aprofundada pelo desenvolvimento de estudos experimentais com a finalidade de se obter a forma adulta (Yamaguti, 1975; Arizmendi-Espinosa, 1992; Díaz *et al.*, 2008; Pinto & Melo, 2010a, b), mas nem sempre com resultados satisfatórios (Pinto & Melo, 2013a), por

causa da complexidade e especificidade envolvidas na maioria dos ciclos de trematódeos (Moszcynska *et al.*, 2009; Locke *et al.*, 2011).

Atualmente, essas adversidades podem ser superadas mediante o uso de ferramentas moleculares, que permitem diferenciar espécies similares morfológicamente (espécies crípticas) em qualquer estágio evolutivo, a elucidação do ciclo de vida do parasito, assim como conhecer aspectos evolutivos e ecológicos desses organismos (Criscione *et al.*, 2005; Olson & Tkach, 2005). Entre as técnicas moleculares para o estudo do DNA, as mais utilizadas na taxonomia e que têm oferecido bons resultados na diferenciação de organismos (dentro e entre filós), está a Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) e o sequenciamento de marcadores genéticos (Folmer *et al.*, 1994; Locke *et al.*, 2015; Tkach *et al.*, 2016). Uma diversidade de regiões genéticas presentes em genes ribossomais e mitocondriais podem ser utilizadas para estudos taxonômicos moleculares, inclusive envolvendo trematódeos, não existindo um consenso sobre qual é o marcador mais confiável (Littlewood, 2008). Os genes do DNA ribossomal têm sido usados extensivamente como marcadores moleculares para estudos filogenéticos, e em eucariontes está conformado por regiões codificantes (18S, 5.8S e 28S), dois espaços transcritos internos (ITS1 e ITS2) e uma espaço não transcrito (NTS) (Wei *et al.*, 2006; Choudhary *et al.*, 2015). Entre eles, o gene da subunidade pequena 18S do rRNA apresenta um tamanho aproximado de 1970 pares de base (pb), tem sido muito utilizado, uma vez que existem múltiplas cópias no genoma, contém regiões altamente conservadas (o que favorece o desenho rápido e simples de *primers*), e também por apresentar regiões variáveis que permitem inferir relações filogenéticas (Blair & Barker, 1993; Blair *et al.*, 1996; Nolan & Cribb, 2005; Perkins *et al.*, 2011).

O gene 18S rRNA foi considerado em estudos para o *DNA barcoding* (código de barra de DNA) em diferentes grupos de organismos, incluindo helmintos, como nematódeos (Bhadury *et al.*, 2006) e trematódeos (Fernandez *et al.*, 1998; Moszcynska *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2013, Figueira *et al.*, 2014; Van Steenkiste *et al.*, 2015). Deste último grupo, foi demonstrada a sua utilização para a identificação de algumas espécies transmitidas por *M. tuberculata* (Routtu *et al.*, 2014). O uso deste marcador permite a identificação até gênero e/ou espécies, além de possibilitar a obtenção de informações filogenéticas que são compatíveis às obtidas com o uso de outros marcadores, tanto mitocondriais (gene da subunidade da citocromo oxidase *c* (COI) quanto nucleares (28S, ITS).

Apesar das vantagens e avanços advindos com a utilização de marcadores moleculares na identificação de trematódeos, a interpretação dos resultados deve ser realizada com cautela,

e sempre que possível, sustentada por dados morfológicos em uma abordagem denominada taxonomia integrada. Exemplos de interpretações equivocadas de informações moleculares existem na literatura. Entre estes, Literák *et al.* (2013) relatam pela primeira a vez a transmissão de uma espécie de gênero *Philophthalmus* por *M. tuberculata* no Peru. Para esse estudo realizaram coletas do molusco para avaliar a infecção pelo trematódeo e para confirmar que o parasito encontrava-se infectando o hospedeiro definitivo, capturaram algumas aves nativas do local para obter a forma adulta. Com o uso de dados moleculares, o parasito foi identificado como *Philophthalmus lucipetus* (Rudolphi, 1819), espécie de origem europeia transmitida por outra espécie de molusco. O equívoco foi discutido por Pinto & Melo (2013b), que considerando a distribuição geográfica do trematódeo, a especificidade para o molusco transmissor e critérios morfológicos, sugeriram a correção da identificação da espécie provisoriamente para *Philophthalmus* sp., embora segundo Heneberg (2013) trata-se de *P. gralli*.

Estudos envolvendo a obtenção de sequências moleculares de diferentes espécies de trematódeos transmitidos por *M. tuberculata* foram realizados na última década, principalmente na Ásia (Skov *et al.*, 2009; Chontanarith & Wongsawad, 2010; Karamian *et al.*, 2011). Contudo, com exceção do trabalho de Literák *et al.* (2013) com a identificação de *P. gralli*, não existem estudos moleculares envolvendo isolados das espécies de trematódeos obtidas de *M. tuberculata* na América do Sul. Além de possibilitar a comparação com sequências moleculares disponíveis para as respectivas espécies oriundas das áreas nativas, tais estudos podem possibilitar inferências sobre as possíveis rotas de introdução e subsidiar estudos futuros visando a identificação de outros hospedeiros envolvidos nos respectivos ciclos biológicos. Estas informações básicas podem servir para direcionar futuras estratégias de controle bem como impedir a introdução e manutenção de trematódeos causadores de outras parasitoses, inclusive de maior relevância, como *C. sinensis* e *P. westermani*.

1.5 Transmissão de trematódeos por moluscos dulciaquícolas no Peru

Pesquisas visando avaliar a participação de moluscos na transmissão de trematódeos no território peruano são extremamente escassas e direcionadas principalmente para as espécies de importância médica e veterinária. Entre estas, existem relatos de espécies do gênero *Lymnaea* Lamarck, 1799 infectadas naturalmente por *Fasciola hepatica* Linnaeus,

1758, principalmente nas áreas montanhosas, onde verifica-se um elevado número de casos humanos (Marcos-Raymundo *et al.*, 2004; Larrea *et al.*, 2007; Londoño *et al.*, 2009). Outro trematódeo de importância na saúde pública peruana, com 325 casos confirmados, é *Paragonimus mexicanus* Miyazaki & Ishii, 1968, parasito pulmonar endêmico no vale de Condebamba (Cornejo *et al.*, 2000; Alvarado *et al.*, 2004; Ibañez-Herrera, 2012), cujo molusco hospedeiro intermediário ainda não foi encontrado infectado naturalmente. Contudo estudos experimentais demonstraram a suscetibilidade de *Aroapyrgus colombiensis* Malek & Little, 1971 (Gastropoda: Hydrobiidae) frente ao parasito (Malek *et al.*, 1985).

Por outro lado, existem relatos de encontros de larvas ainda não identificadas em nível específico. Entre estes, Maurtua & Tantaleán (1992) avaliaram a infecção de diferentes espécies de moluscos dulciaquícolas (famílias Hydrobiidae, Physidae, Planorbidae, Lymnaeidae, Ampullaridae e Amnicolidae) de algumas localidades do Peru e encontraram 5 tipos cercarianos diferentes (monostoma ocelada, monostoma xifidiocerca, distoma xifidiocerca, distoma ocelada e distoma furcocerca) ainda não conhecidos. Larrea *et al.* (2007), além de detectar a emergência de larvas de *F. hepatica*, também observaram dois tipos diferentes de cercárias (furcocerca e xifidiocerca). Mais recentemente, Literák *et al.* (2013), encontraram e identificaram a emergência da cercária de *P. gralli*, bem como observaram outros dois tipos cercarianos, os quais segundo os autores, correspondem às famílias Paramphistomidae e Heterophyidae.

É importante ressaltar que a importância médica das espécies zoonóticas transmitidas por *M. tuberculata* demonstra-se mais evidente no Peru, uma vez que a existência de hábitos culinários com pratos típicos preparados a partir de peixes crus (p. ex. *Ceviche*), principalmente no litoral desse país, podem favorecer a transmissão de parasitos que precisam de peixe como segundo hospedeiro intermediário, como *C. formosanus* e *H. pumilio*. Nesse sentido, a possibilidade da ocorrência de casos humanos destas parasitoses não pode ser descartada no território peruano.

Nesse estudo, a identificação morfológica e molecular de trematódeos transmitidos por *M. tuberculata* no Peru poderá contribuir para o melhor conhecimento da diversidade destes parasitos. Diante do potencial zoonótico destas espécies invasoras de trematódeos, as informações a serem obtidas em estudos envolvendo estes parasitos, podem contribuir para o avanço do conhecimento sobre a distribuição e controle destes parasitos na região neotropical.

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que *Melanoides tuberculata* é um molusco invasor responsável pela transmissão de trematódeos de importância médica e veterinária, com potenciais impactos na biodiversidade presente em áreas naturais, estudos visando ampliar o conhecimento da diversidade e distribuição dos parasitos transmitidos por ele, são necessários no continente americano. No Peru, país em que os estudos envolvendo larvas de trematódeos e ciclos biológicos são escassos, eles se tornam ainda mais relevantes, uma vez que a existência de hábitos alimentares que envolvem o consumo de pratos típicos preparados com peixes crus constitui um fator de risco para a transmissão de várias das espécies de trematódeos transmitidas por *M. tuberculata*. Além disso, a utilização de sequências moleculares para a identificação destes parasitos pode subsidiar estudos futuros visando identificar os diferentes estágios evolutivos nos diferentes hospedeiros envolvidos nos respectivos ciclos biológicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a participação de *Melanoides tuberculata* na transmissão de trematódeos no Peru.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a infecção natural de *M. tuberculata* por larvas de trematódeos em coleções aquáticas naturais localizadas no litoral peruano.
- Realizar estudos experimentais visando a obtenção de parasitos adultos.
- Caracterizar morfológicamente os estágios evolutivos obtidos.
- Identificar molecularmente as espécies encontradas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Para o presente estudo foram selecionadas duas áreas pantanosas do litoral central do Peru, nas quais já foi detectada a presença de *M. tuberculata* (Ramírez *et al.*, 2003; Carazas *et al.*, 2015b). As áreas são: *Refugio de Vida Silvestres Pantanos de Villa* e *Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla*, localizadas no estado de Lima e na *Provincia Constitucional del Callao*, respectivamente. Em cada ponto de coleta foi realizado o georreferenciamento com auxílio de aplicativo GPS Status & Toolbox (MobiWIA Ltd) executado com o sistema operativo Android (versão 5.0.1). É importante mencionar que as coletas malacológicas nas áreas de conservação citadas acima foram autorizadas pelas autoridades competentes, i.e *PROHVILLA Autoridad Municipal de los Pantanos de Villa* e *Gobierno Regional del Callao*, respectivamente para o *Refugio de Vida Silvestres Pantanos de Villa* e *Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla*.

4.1.1 Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla

Foi criada em 20 de dezembro de 2006 e é administrada pelo *Gobierno Regional Del Callao*. Conta com 275,75 hectares e caracteriza-se por apresentar uma extensa vegetação e vários corpos de água. É formada pelo afloramento da bacia do rio Chillón, pelas águas de infiltração marinha da praia Ventanilla por efluentes de uma estação de tratamento de águas residuais próxima da área, e pelos efluentes de águas residuais das zonas urbanas adjacentes. Aproximadamente 15,600 pessoas habitam nos arredores da área, que carecem de serviço de água potável e de esgotamento (Moschella, 2012).

A flora desse ecossistema é muito diversa, formando 4 comunidades vegetais, as quais criam um ambiente propício para diferentes organismos. Quanto à fauna de vertebrados, é representada principalmente por aves (121 espécies, entre migratórias e residentes). Sobre as aves migratórias, podem-se mencionar algumas provenientes de América do Norte, assim como de algumas regiões dos Andes do Peru (Carazas *et al.*, 2015a). A ictiofauna é representada apenas por três espécies de peixes introduzidas antes da criação da área e para a fauna malacológica, só existem registros de *Hydrobia* sp. e *M. tuberculata* (Carazas *et al.*, 2015b).

Para as amostragens de moluscos nessa área, foram selecionadas duas estações de coletas: A ($11^{\circ} 52' 30,89''\text{S}$; $77^{\circ} 8' 37,25''\text{O}$) e B ($11^{\circ} 52' 38,60''\text{S}$; $77^{\circ} 8' 40''\text{O}$), representadas nas figuras 1 e 2.

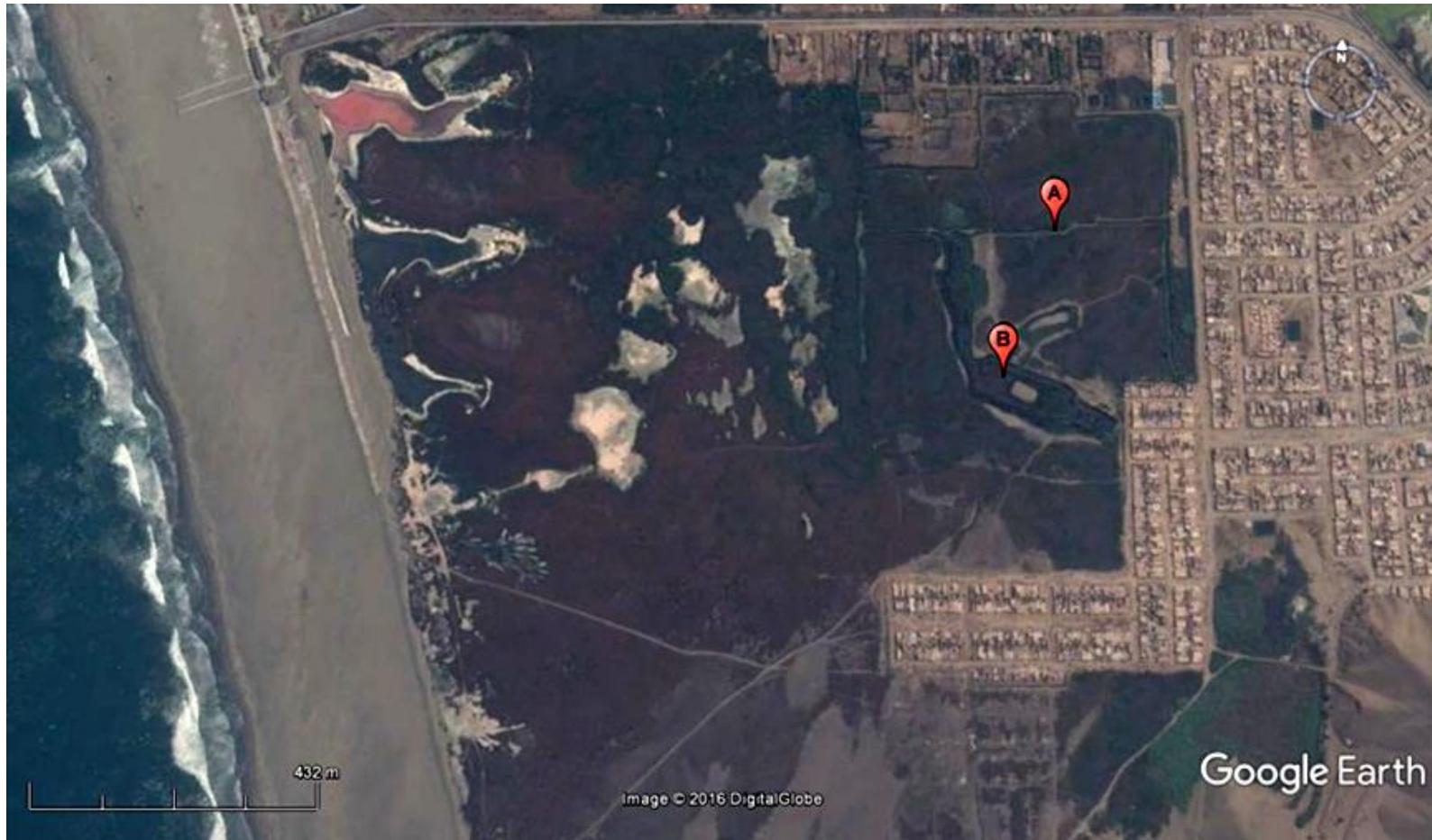


FIGURA 1 - Vista aérea da *Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla*, Peru, indicando as estações de coletas de moluscos realizadas em dezembro de 2015 e janeiro e julho de 2016. A estação de coleta A corresponde a um canal de água, e a estação B, a uma lagoa. Fonte: Google Earth.



FIGURA 2 - Vista panorâmica das estações de coleta na *Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla*, Peru. (a) Canal de água e (b) lagoa, próximos a moradias. (c, d) Atividades de lazer realizadas por moradores nos arredores da área pantanosa.

4.1.2 Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa

O Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa é uma área pantanosa, localizada no sul da cidade de Lima, no distrito de Chorrillos, próximo ao Oceano Pacífico. Em 1989, foi reconhecido como área natural protegida para a conservação da flora e fauna. Pela importância deste ecossistema, em 1997, foi denominado Sítio Ramsar pela *Convención Relativa aos Pantanos de Importancia Internacional Especialmente como Hábitat de Aves Acuáticas*, por ser um ambiente propício para uma variedade de aves migratórias, tanto de América do Norte como dos Andes. Finalmente, em 2006, foi categorizada como *Refugio de Vida Silvestre* (INRENA, 1998; Iannacone *et al.*, 2010).

Esta área apresenta uma extensão territorial atual de 263,27 hectares e é possível observar moradias, clubes, áreas de recreação e fábricas estabelecidos nos arredores, que ao longo dos últimos anos, tais construções provocaram uma diminuição do tamanho do pantanal. Forma parte do sistema hidrológico do rio Rímac através da formação de um aquífero entre os bairros de Ate, Surco e Chorrillos, permitindo o fluxo de água, chegando finalmente até as lagoas e canais aquáticos (INRENA, 1998).

A fauna silvestre da área está representada principalmente por aves, registrando-se a presença de 210 espécies. Nas coleções aquáticas, são conhecidas 13 espécies de peixes (SERNANP, 2016), que em sua maioria são espécies introduzidas. Quanto aos moluscos, conhece-se da presença de 8 moluscos dulciaquícolas: *Heleobia cumingii* (Orbigny, 1835), *Physa venustula* Gould, 1848, *Melanooides tuberculata*, *Physa peruviana* Gray, 1828, *Helisoma trivolvis* (Say, 1817), *Helisoma peruvianum* (Broderip, 1832) *Drepanotrema kermatoides* (Orbigny, 1835) e *Hydrobia* sp. (Chinchayán *et al.*, 2008). Entre organismos vertebrados presentes, podem-se citar morcegos, roedores, répteis e anfíbios. Essa área pantanosa é muito estudada, não só pela diversidade animal existente, mas também por sua flora, com 65 espécies de plantas silvestres (Ramírez *et al.*, 2010). Pela grande biodiversidade e pelas paisagens naturais, o turismo é desenvolvido, oferecendo uma alternativa recreativa, principalmente para estudantes de escolas e universidades. Isso permite o desenvolvimento econômico na região, e ao mesmo tempo, conscientiza às pessoas no cuidado do pantanal (INRENA, 1998).

Para a realização das coletas, foram selecionadas quatro estações (Figuras 3 e 4). A estação C (12° 12' 33,51'' S; 76° 59' 27,68'' O) corresponde à *Laguna Mayor*. La *Laguna Génesis* foi a estação D (12° 12' 43,14'' S; 76° 59' 21,38'' O). As estações E (12° 13'

26,96'' S; 76° 59' 21,75'' O) e F (12° 13' 20,67'' S, 76° 59' 14,82'' O) são respectivamente a *Laguna de Marvilla* e um canal de água, próximos ao mar.



FIGURA 3 - Vista área do *Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa*, Peru, com a localização das estações de coletas realizadas em janeiro e junho de 2016. Fonte: Google Earth.



FIGURA 4 - Vista panorâmica das estações de coleta no *Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa*, Peru. (a) *Laguna Mayor*, (b) *Laguna Génesis*, (c) Canal de água, (d) *Laguna de Marvilla*.

4.2 Coletas de moluscos

As coletas de moluscos foram realizadas, nos meses de dezembro de 2015 e janeiro, junho e julho de 2016, em ambas as áreas naturais mencionadas anteriormente. Os caramujos foram coletados em pontos acessíveis com auxílio de uma rede de nylon em forma de D (puçá), a qual foi passada pelas margens das lagoas e/ou canais de água, percorrendo entre 20 a 30 metros. Em cada dia e local de coleta, realizou-se um esforço amostral de 60 minutos.

Todo o material coletado foi acondicionado em sacos plásticos, devidamente etiquetados e transportados para o *Laboratorio de Parasitologia en Fauna Silvestre e Zoonosis* da *Facultad de Ciencias Biológicas* da *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, localizado na cidade de Lima, Peru, onde, realizou-se o processo de triagem, que consistiu na separação dos exemplares de *M. tuberculata* de materiais orgânicos. Em seguida os tiarídeos coletados foram lavados em água corrente, submetidos à avaliação da infecção por larvas de trematódeos, e posteriormente, contados.

4.3 Avaliação da infecção dos moluscos por larvas de trematódeos

Para avaliar a infecção por trematódeos, os moluscos coletados foram colocados individualmente em placas de poliestireno para cultura de células de 24 poços, e em seguida, adicionou-se 3 mL de água desclorada. No mesmo dia das coletas, os caramujos foram expostos à fotoestimulação artificial (lâmpada de 60W) por 2 horas e examinados com auxílio de microscópio estereoscópico para observar a presença de larvas de trematódeos. As placas contendo os moluscos foram deixadas durante a noite e novos exames foram realizados na manhã seguinte, antes e após fotoestimulação.

Amostras de exemplares infectados por trematódeos foram separados e determinou-se a taxa de infecção para cada tipo cercariano. Posteriormente, os moluscos positivos foram transportados para o Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, para a realização de estudos experimentais. Ressalta-se que o material biológico transportado é isento de licença de exportação devido a revogação da Instrução Normativa 154 de 2007, conforme orientação fornecida pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (em anexo).

4.4 Estudos experimentais

4.4.1 Obtenção de metacercárias

Para a obtenção das metacercárias, preliminarmente realizou-se a identificação dos tipos cercarianos emergidos dos moluscos naturalmente infectados, etapa que permitiu a caracterização do possível padrão de ciclo biológico das espécies encontradas (Díaz *et al.*, 2008; Pinto & Melo, 2010a, b, 2012b). Cabe ressaltar que foram realizadas novas fotoestimulações para se obter as quantidades de cercárias necessárias para os trabalhos de experimentação.

No caso das espécies cujo tipo cercariano sugere a formação de metacercárias em substrato sólido (e.g. larvas do tipo *Megalura*), as larvas foram observadas em estereomicroscópio e a ocorrência do encistamento nos próprios poços das placas ou nas conchas dos moluscos foi avaliada. Posteriormente, elas foram desencistadas ao serem submetidas à água quente (42°C) antes da infecção do hospedeiro definitivo, de acordo com Cheng & Thakur (1967).

Para as espécies que necessitam de peixes como segundos hospedeiros intermediários (e. g. larvas dos tipos pleurolofocerca, gimnocéfala e parapleurolofocerca), foi utilizado como modelo experimental *Poecilia reticulata* Peters, 1859 criados e mantidos em laboratório. Grupo de 30 exemplares adultos (de ambos os sexos) entre 2 a 4 cm de comprimento total foram utilizados para cada tipo cercariano encontrado. Os peixes foram colocados individualmente em placas para cultura de células de poliestireno de 6 poços (contendo 3 mL de água isenta de cloro), sendo adicionada em seguida uma alíquota de água contendo aproximadamente 50 ou 100 cercárias. Os peixes foram deixados em contato com as cercárias por 24 horas, e posteriormente, foram transferidos para recipientes de plásticos de 3 litros de capacidade, corretamente rotulados e alimentados com ração especial para esse tipo de animal.

Visando a pesquisa das metacercárias nos hospedeiros experimentalmente infectados, os peixes foram eutanasiados por decaptação e necropsiados após 30 dias de infecção. O fígado, brânquias e as aletas foram transferidos para lâminas de vidro contendo solução fisiológica (NaCl 0,85%) e examinados em microscópio estereoscópico para a pesquisa das formas parasitárias. O mesmo procedimento foi realizado para exemplares que morreram antes de se completar o tempo de infecção estabelecido.

4.4.2 Infecção experimental de hospedeiros definitivos

Vinte metacercárias obtidas a partir de cercárias do tipo *Megalura* (previamente desencistadas termicamente) foram inoculadas diretamente em cada olho de dois exemplares de *Gallus gallus domesticus* Linnaeus, 1758 (Galliformes: Phasianidae) com aproximadamente uma semana de vida. Estes animais foram adquiridos em um estabelecimento comercial na cidade de Belo Horizonte. As aves foram mantidas em gaiolas, recebendo diariamente água e alimento (milho triturado) *ad libitum*.

Para as metacercárias viáveis recuperadas em peixes, foram utilizados exemplares machos de *Mus musculus* Linnaeus, 1758 (Rodentia: Muridae) da linhagem Swiss, com aproximadamente 20 dias de idade. As metacercárias recuperadas das brânquias de *P. reticulata* expostos a larvas do tipo *Pleurolofocerca* foram inoculadas pela via oral (com auxílio de uma micropipeta de 50 µL) em três exemplares camundongos nas seguintes quantidades: 201, 203 e 208. Metacercárias (59 no total) encontradas nas bases das aletas dos peixes expostos às larvas do tipo *Parapleurolofocerca* foram inoculadas oralmente em apenas um exemplar de camundongo. Ressalta-se que os roedores infectados receberam uma dose diária de 50 mg/kg (via subcutânea) de fostato dissódico de dexametasona (Decadron®, Ache, Brasil), desde o primeiro de infecção até um dia antes da eutanásia. Esses animais foram mantidos em condições laboratoriais com água e alimentação (ração para animais de laboratório Labina, Purina®, Campinas, São Paulo) *ad libitum*.

4.4.3 Exame parasitológico

Para avaliar a infecção dos hospedeiros definitivos, amostras de fezes foram coletadas de cada camundongo a partir do quinto dia pós-infecção (DPI), e processadas pelo método de sedimentação espontânea (Lutz, 1919). No caso das aves, além do exame parasitológico de fezes, realizaram-se lavados oculares com solução salina (NaCl a 0,85%) antes da necropsia, no trigésimo dia pós-infecção. Para cada exame foram consideradas a observação de 5 lâminas ao microscópio óptico.

4.4.4 Recuperação de parasitos adultos

Os camundongos e aves experimentalmente infectados foram eutanasiados aos 6-7 e 30 dias DPI, respectivamente. No caso dos roedores, a cavidade abdominal foi exposta e as vísceras foram removidas, sendo transferidas para placas de Petri contendo solução fisiológica (NaCl 0,85%). O intestino delgado foi dividido em três porções (anterior, médio e posterior) sendo colocados individualmente em placas de Petri. Em seguida, foram abertos longitudinalmente (com auxílio de uma tesoura) e realizou-se a raspagem da mucosa com auxílio de lâminas de vidro. Em relação às aves, a conjuntiva e da membrana nictitante foram cuidadosamente examinadas quanto à presença de parasitos adultos.

A pesquisa de formas adultas em cada órgão foi feita em estereomicroscópio, sendo os parasitos coletados mediante a utilização de estiletes e pinças, e posteriormente, transferidos para placas de Petri contendo solução salina.

4.4.5 Comitê de ética

Para a realização dos ciclos experimentais, o projeto do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 20/2016).

4.5 Estudo taxonômico dos estágios evolutivos

As cercárias emergidas de exemplares de *M. tuberculata* naturalmente infectados foram coletadas com auxílio de micropipeta para a montagem de preparações não permanentes, com corantes vitais (solução aquosa de vermelho neutro e sulfato azul do Nilo a 0,05%) entre lâmina e lamínula. Alíquotas de soluções aquosas contendo cercárias foram fixadas em solução de formalina 10% (à quente), submetidas a processo de coloração pelo carmim acético, seguida de desidratação em série crescente de alcoóis, clarificação em creosoto de Faia e montagem de preparações permanentes em bálsamo do Canadá, entre lâmina e lamínula de vidro (Melo, 2008). Os parasitos adultos recuperados foram distendidos entre lâminas de vidro, fixados em solução de formalina 10% e posteriormente corados e montados conforme procedimento realizado para os estágios larvais descrito acima.

No caso de parasitos extremamente pequenos (<400µm), realizou-se a fixação segundo a metodologia descrita para cercárias.

O estudo morfológico dos estágios evolutivos obtidos foi realizado em microscópio de luz. As mensurações das cercárias e parasitos adultos foram realizadas com auxílio de ocular micrometrada e expressas em micrômetros (µm). Os dados morfométricos foram tabulados e analisados em software Microsoft® Excel 2010. Os registros fotográficos foram obtidos com câmara digital Leica ICC50 HD e analisados com a utilização do software Leica Application Suite (LAZ EZ), versão 2.0.

A identificação dos tipos cercarianos foi realizada segundo descrições morfológicas preconizadas por diversos autores (Dawes, 1946; Schell, 1970; Frandsen & Christensen, 1984; Pinto & Melo, 2013a). A determinação dos parasitos adultos obtidos experimentalmente até a menor categoria taxonômica foi realizada segundo chaves de identificação de trematódeos (Jones *et al.*, 2005; Bray *et al.*, 2008) e trabalhos descritos por diversos autores.

Preparações permanentes em bálsamo de Canadá foram depositadas nas coleções de invertebrados do Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados da Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brasil) e do *Laboratório de Parasitologia en Fauna Silvestre e Zoonosis* da *Universidad Nacional Mayor de San Marcos* (Lima, Peru).

4.6 Caracterização molecular

4.6.1 Fixação dos estágios evolutivos

Alíquotas dos diferentes tipos cercarianos encontrados em exemplares de *M. tuberculata* infectados naturalmente e de adultos recuperados após o estudo experimental, foram transferidos de forma separada para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. As formas parasitárias presentes nos tubos eram sedimentadas naturalmente ou por centrifugação, e em seguida, a maior parte possível do sobrenadante foi retirada com auxílio de uma micropipeta de 50 µL. Imediatamente, se adicionou 1 mL de etanol a 90% em cada tubo, sendo rotulados e conservados a -20°C. Além disso, foram consideradas amostras morfológicamente idênticas, provenientes de espécimes do tiarídeos coletados no estado de Minas Gerais, Brasil, as quais foram fixadas e conservadas nas mesmas condições mencionadas anteriormente.

4.6.2 Extração e quantificação do DNA

A extração de DNA das amostras obtidas (Peru e Brasil) previamente fixadas em etanol a 90% foi realizada segundo o protocolo de isolamento de DNA genômico a partir de tecido animal, do kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega®, EUA). A dosagem do material genético extraído foi determinada pelo espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000, tomando em consideração a relação 260/280 nm.

4.6.3 Amplificação de DNA

O marcador molecular selecionado para o presente estudo foi o gene nuclear 18S rRNA. A amplificação desta região é extensivamente empregada no estudo molecular de trematódeos, tanto em estudos filogenéticos quanto para a identificação taxonômica. Os *primers* utilizados para essa fase foram o 18S9modF (5' – GATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTG – 3') e 18S637modR (5' – TACGCWYTGGAGCTGGAGTTACCG – 3') modificados por Van Steenkiste *et al.* (2015) mas desenhados inicialmente por Moszczyńska *et al.* (2009). Estes primers amplificam um fragmento de 560 a 580 pares de base (bp).

A amplificação do DNA foi realizada por PCR. Considerou-se um volume total de 25 µL, que incluiu: 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, EUA), 0,625 µL de cada *primer* (com uma concentração final de 0,1 µM cada), 8,75 µL de água ultrapura (Milli-Q) e 2,5 µL de DNA com concentração entre 25 a 50 ng. A PCR foi realizada em termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Alemanha), tomando em consideração as condições descritas por Moszczyńska *et al.* (2009), que são: 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 30s, 50°C por 30s e 72°C por 1 min, com uma extensão final a 72°C por 10 min. Para evidenciar a ausência de contaminantes, incluiu-se o uso do controle negativo, com a substituição de DNA por água. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v), e corados com GelRed® (Biotium, EUA).

4.6.4 Purificação dos produtos de PCR

Após a visualização das bandas no gel, realizou-se a purificação dos produtos da PCR com polietileno glicol (PEG) (20% PEG 8.000 em solução de NaCl 2,5M) (Promega, EUA). Para garantir a recuperação de uma quantidade suficiente do fragmento de DNA amplificado, realizou-se a PCR de cada amostra em duplicata, sendo utilizados 50 µL do produto da reação para a purificação. O conteúdo foi transferido a um tubo de microcentrífuga de 0,5 mL, adicionando em seguida PEG na mesma quantidade e posteriormente, homogeneizado em vórtex por 1 minuto. Colocou-se o tubo em banho seco a 37°C por 15 minutos, e em seguida este foi centrifugado por 15 min a 14.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, adicionaram-se 125 µL de etanol 80% refrigerado, após centrifugação por 5 min a 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado. O passo mencionado anteriormente foi repetido duas vezes mais. O tubo foi mantido à temperatura ambiente até a evaporação de todo o etanol. Por fim, o DNA foi resuspenso em 20 µL de água ultrapura e dosado.

4.6.5 Sequenciamento de DNA

Os produtos da PCR purificados foram preparados para o sequenciamento segundo as recomendações da empresa Myleus Biotechnology (Belo Horizonte, Brasil) (<https://www.myleus.com/>), sendo sequenciadas por eletroforese capilar com o sequenciador automático ABI3730, utilizando-se polímero BigDye v3.1 e POP7.

4.6.6 Análises das sequências

As sequências obtidas foram montadas e editadas com auxílio do programa ChromasPro versão 2.0.1 (Technelysium Pty Ltd, Austrália), para a obtenção de uma única sequência consenso. Para a pesquisa de similaridade, foi utilizado o programa *Basic Alignment Search Tools* (BLAST) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (*National Library of Medicine*, EUA). Em seguida, as sequências foram alinhadas com auxílio do programa MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). As comparações das sequências obtidas no presente trabalho, assim como de sequências depositadas no GenBank (Tabela 1) foram realizadas usando o modelo de sequência evolutiva Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993), com auxílio do programa MEGA 7.0. A árvore

filogenética foi criada a partir do algoritmo baseado no método filogenético de Máxima Verossimilhança (ML) (Felsenstein, 1981). A sequência do trematódeo *Lobatostoma manteri* Rohde, 1973 (Aspidogastridae) foi utilizada como grupo externo (*outgroup*). A confiabilidade das análises foi medida pela utilização do teste *bootstrap* com 1000 repetições para avaliar a robustez dos ramos das árvores geradas.

Tabela 1 – Informações sobre as sequências parciais do gene 18S rRNA de trematódeos das famílias Heterophyidae, Philophthalmidae e Rencolidae depositadas no GenBank, utilizadas na construção da árvore filogenética. (*): Hospedeiros experimentais; NE: Não especificado.

Família	Espécie	Localidade	Hospedeiro	Número de acesso
Heterophyidae	<i>Centrocestus formosanus</i>	Tailândia	<i>Mesocricetus auratus</i> *	HQ874608.1
	<i>C. formosanus</i>	EUA	NE	AY245759.1
	<i>Centrocestus</i> sp.	Egito	<i>Tilapia zillii</i>	AY245699.1
	<i>Haplorchis pumilio</i>	Tailândia	<i>Mesocricetus auratus</i> *	HM004196.1
	<i>H. pumilio</i>	Israel	<i>Phalacrocorax carbo</i>	AY245706.1
	<i>Haplorchis taichui</i>	Tailândia	<i>Mesocricetus auratus</i> *	HM004213.1
	<i>H. yokogawai</i>	Tailândia	<i>Mesocricetus auratus</i> *	HM004208.1
	<i>Procerovum varium</i>	Tailândia	<i>Anabas testudineus</i>	HM004205.1
	Metacercária não identificada	Egito	<i>Tilapia zillii</i>	AY245704.1
Philophthalmidae	<i>Philophthalmus gralli</i>	Peru	<i>Tachuris rubrigastra</i>	JX121231.1
	Philophthalmid sp.	Austrália	<i>Batillaria australis</i>	AY222133.1
Rencolidae	<i>Rencicola lari</i>	República Checa	<i>Chroicocephalus ridibundus</i>	KU563698.1
	<i>Rencicola</i> sp.	Ucrania	<i>Numenius arquata</i>	AY222155.1

5 RESULTADOS

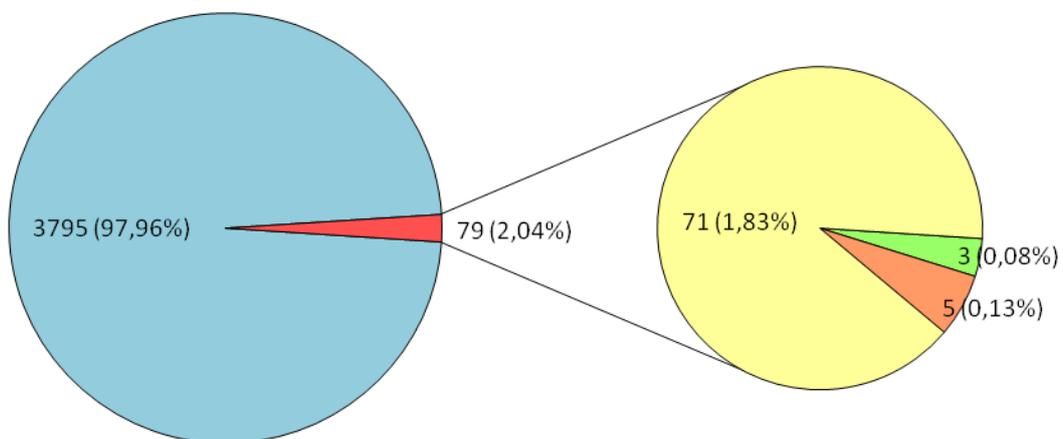
5.1 Coletas de moluscos e avaliação da infecção por larvas de trematódeos

No total, em ambas as áreas pantanosas avaliadas, foram coletados e examinados 6.731 exemplares de *M. tuberculata*, dos quais 127 (1,89%) apresentaram-se infectados por larvas de trematódeos. Os dados sobre a quantidade de exemplares obtidos e a avaliação da infecção pelos diferentes tipos cercarianos encontrados nas 20 coletas realizadas nos meses de dezembro de 2015 e janeiro, junho e julho de 2016 na *Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla* e no *Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa*, são representados na figura 5. Os tiarídeos coletados por dia e a taxa de infecção pelas larvas de trematódeos em cada área natural, são apresentados na tabela 2.

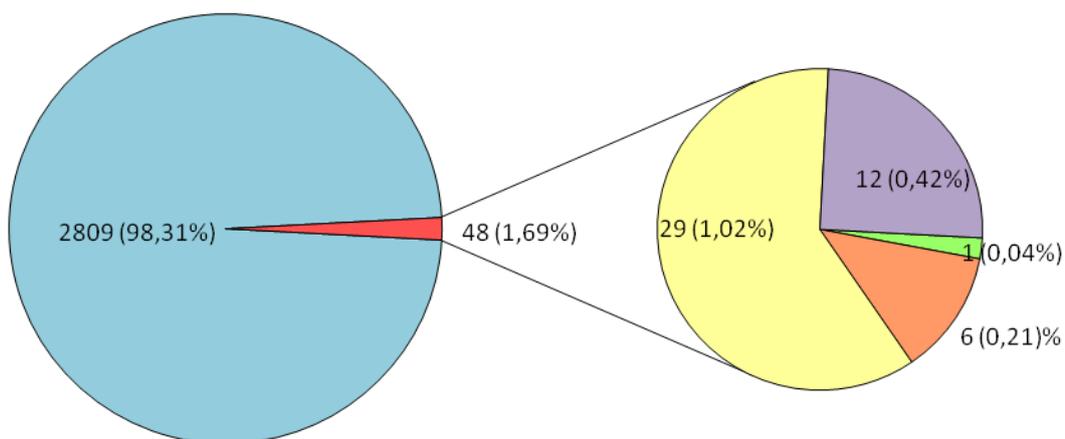
Na *Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla*, dos 3.874 moluscos coletados, detectou-se a infecção de 79 tiarídeos, sendo três tipos cercarianos identificados preliminarmente como: Gimnocéfala (0,08%), Megalura (0,13%) e Pleurolofocerca (1,83%). A infecção dos moluscos pelas larvas foi variável nos dois pontos de coleta. Na estação B foram achados os três tipos de cercárias, enquanto na estação A, somente o tipo Pleurolofocerca. Além disso, a emergência das três larvas de trematódeos foi detectada tanto em janeiro como em julho de 2016.

Quanto ao *Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa*, das 4 estações selecionadas para a realização das coletas, apenas na estação E não se encontraram moluscos vivos. Foram coletados 2.857 exemplares de *M. tuberculata* e quatro tipos de cercárias emergiram dos moluscos estudados, que são: Gimnocéfala (0,04%), Megalura (0,21%), Pleurofocerca (1,02%) e Parapleurolofocerca (0,42%). Detectou-se a transmissão das quatro larvas de trematódeos na estação C. O tipo cercariano Pleurolofocerca esteve presente em todas as estações onde se encontraram moluscos vivos e durante todo o tempo das coletas, enquanto larvas do tipo Gimnocéfala não foram encontradas durante o mês de junho.

Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla



Refugio Silvestre Pantanos de Villa



- | | | |
|---|---|---|
| ■ Não Infectados | ■ Cercária Gimnocéfala | ■ Cercária Pleurolofocerca |
| ■ Infectados | ■ Cercária Megalura | ■ Cercária Parapleurolofocerca |

FIGURA 5 - Exemplos de *Melanoides tuberculata* coletados durante dezembro de 2015 e janeiro, junho e julho de 2016 nas áreas naturais localizadas no litoral central do Peru e respectivos percentuais da infecção por larvas de trematódeos.

Tabela 2 - Exemplos de *Melanoides tuberculata* coletados e a taxa de infecção por tipos cercarianos em cada uma das 20 coletas malacológicas realizadas nas estações de coleta selecionadas nas duas áreas naturais localizadas no litoral central do Peru, durante os meses de dezembro de 2015 e janeiro, junho e julho de 2016. PL: Pleurolofocerca, ME: Megalura, GI: Gimnocéfala, PA: Parapleurolofocerca. Letra no superíndice de cada número de coleta indica a estação.

Localidade	N° de coleta	Data	Coletados	Infectados							
				Tipo cercariano							
				PL	%	ME	%	GI	%	PA	%
<i>Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla</i>	1 ^A	15/12/15	135	1	0,74	-	-	-	-	-	-
	2 ^A	17/12/15	698	2	0,29	-	-	-	-	-	-
	3 ^B	12/01/16	969	3	0,31	-	-	1	0,10	-	-
	4 ^B	14/01/16	754	1	0,13	2	0,27	-	-	-	-
	5 ^B	15/01/16	247	-	-	-	-	-	-	-	-
	6 ^B	07/07/16	129	6	4,65	-	-	-	-	-	-
	7 ^B	12/07/16	394	25	6,35	-	-	2	0,51	-	-
	8 ^B	14/07/16	548	33	6,02	3	0,55	-	-	-	-
	Total		3874	71	1,83	5	0,13	3	0,08	-	-
<i>Refugio Silvestre Panntano de Villa</i>	9 ^C	20/01/16	920	1	0,11	-	-	1	0,11	-	-
	10 ^D	22/01/16	200	2	1	-	-	-	-	2	1
	11 ^E	26/01/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12 ^F	26/01/16	206	4	1,94	1	0,49	-	-	-	-
	13 ^C	26/01/16	152	-	-	-	-	-	-	1	0,66
	14 ^C	28/01/16	645	-	-	1	0,16	-	-	2	0,31
	15 ^C	21/06/16	244	1	0,41	-	-	-	-	2	0,82
	16 ^D	23/06/16	41	-	-	-	-	-	-	-	-
	17 ^E	28/06/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18 ^F	28/06/16	108	15	13,89	2	1,85	-	-	-	-
	19 ^C	30/06/16	152	2	1,32	1	0,66	-	-	1	0,66
	20 ^C	05/07/16	189	4	2,12	1	0,53	-	-	4	2,12
	Total		2857	29	1,02	6	0,21	1	0,04	12	0,42
TOTAL GERAL			6731	100	1,49	11	0,16	4	0,06	12	0,18

5.2 Estudos experimentais e taxonômicos

Dos quatro diferentes tipos cercarianos emergidos de exemplares de *M. tuberculata* do *Refugio Silvestre Pantanos de Villa*, conseguiu-se através da realização de infecções experimentais, a obtenção das formas adultas de três espécies de trematódeos. Um tipo cercariano foi identificado presuntivamente até o nível de gênero. As características morfológicas dos estágios evolutivos das diferentes espécies encontradas no presente estudo são descritas a seguir.

5.2.1 *Centrocestus formosanus*

5.2.1.1 Posição taxonômica

Filo: Platyhelminthes Gegenbaur, 1859

Classe: Trematoda Rudolphi, 1808

Subclasse: Digenea Carus, 1863

Ordem: Opisthorchiida La Rue, 1957

Superfamília: Opisthorchioidea Looss, 1899

Família: Heterophyidae Leiper, 1909

Subfamília: Centrocestinae Looss, 1899

Gênero: *Centrocestus* Looss, 1899

Espécie: *C. formosanus* (Nishigori, 1924)

5.2.1.2 Caracterização morfológica e morfométrica

Cercárias (figura 6) (n=30): larvas pequenas e oceladas, do tipo Pleurolofocerca. Corpo coberto de diminutos espinhos conspícuos principalmente na região anterior. Em repouso ou em exemplares fixados em formalina a quente, o corpo apresenta formato piriforme ou cordiforme, medindo 98 ± 8 (83-115) de comprimento por 71 ± 5 (62-83) de largura. Observaram-se grupamentos de células cistogênicas, distribuídas em todo o corpo. Cauda simples, com anulações transversais no tegumento e processo espiniforme conspícuo na extremidade posterior, apresentando também uma membrana ondulante (*finfold*) dorso-

ventral que ocupa aproximadamente 3/4 posteriores do comprimento total. A cauda possui grupamentos de células em ambas as extremidades, sendo evidentes em larvas coradas. O comprimento e largura da cauda são 132 ± 8 (119-150) por 17 ± 1 (14-19), respectivamente. Ventosa oral subterminal medindo 25 ± 2 (21-29) de comprimento por 21 ± 1 (17-24) de largura, com 9 espinhos aciculares, 4 localizados anteriormente e 5 posteriores. Ventosa ventral vestigial. Faringe muscular, 9 de comprimento por 7 ± 1 (7-9) de largura. Cecos intestinais curtos, cujas terminações são difíceis de observar pela sobreposição com as glândulas de penetração. Estas últimas estão presentes em um número total de 14, de aspecto saculiforme e núcleo evidente, distribuídas lateralmente em dois grupos de 7 glândulas, próximas à área equatorial. Os canalículos das glândulas atingem a ventosa oral, sendo agrupadas em 3:4:4:3. Vesícula excretora oval e do tipo epitelial.

As cercárias emergidas dos moluscos infectados eram muito ativas, com movimentos bruscos, de lado a lado, tanto o corpo quanto da cauda e sobrevivem em água isenta de cloro por até 48 horas após emergência. No entanto, após este período, realizam poucos movimentos ou se mantêm em repouso. A emergência dessas larvas após fotoestimulação é muito variável, desde poucos exemplares até quantidades difíceis de contar, sendo observado isso último, em moluscos com comprimento maior que 3 centímetros.

Metacercárias (figura 7) (n=20): cistos arredondados com parede espessa após 30 DPI, 158 ± 17 (123-185) de comprimento por 118 ± 8 (103-130) de largura. Estão localizadas nos filamentos e arcos branquiais dos peixes infectados experimentalmente. A larva encistada apresenta pequenos espinhos aciculares no tegumento. A ventosa oral possui 32 espinhos bem desenvolvidos, distribuídos equitativamente, formando duas coroas. Ventosa ventral evidente e vesícula excretora em forma de X, bem característica.

Dos trinta exemplares de *P. reticulata* infectados com alíquotas de solução cercariana contendo aproximadamente 200 larvas do tipo Pleurolofocerca, nove morreram um dia após da infecção. Estes espécimes foram necropsiados e evidenciaram-se metacercárias imaturas, com uma fina membrana e com ocelos ainda evidentes. Cabe ressaltar que peixes mantidos no laboratório, por até 210 DPI, ainda apresentavam metacercárias viáveis nos filamentos branquiais.

Adultos (figura 8) (n=30): Corpo espinhoso de aspecto piriforme, 362 ± 29 (288-418) de comprimento por 158 ± 16 (137-192) de largura. Ventosa oral subterminal, 37 ± 3 (31-43) de comprimento por 23 ± 2 (19-26) de largura, com dupla coroa de 16 espinhos aciculares cada. Faringe muscular, 45 ± 2 (41-50) de comprimento por 38 ± 3 (34-43) de largura. Pré-

faringe e esôfago, curtos. Cecos intestinais estendendo-se até a margem superior do ovário. Ventosa ventral oval e bem desenvolvida, 37 ± 3 (31-43) de comprimento por 46 ± 3 (36-50) de largura. Dois testículos ovalados, lisos e opostos entre si, localizados na região posterior. Testículo direito 34 ± 3 (28-41) de comprimento por 51 ± 5 (43-60) de largura, esquerdo 35 ± 3 (29-41) por 52 ± 5 (45-60). Vesícula seminal bipartita, cuja parte anterior é mais próxima à ventosa ventral, localizada no lado direito. Ovário ovalado, liso ou ligeiramente lobado e localizado acima do testículo direito, 31 ± 3 (26-40) de comprimento por 52 ± 5 (43-60) de largura. Receptáculo seminal oval ou esférico, ocupando geralmente a região pré-testicular. Útero contendo quantidade variável de ovos (entre 1 a 24). Ovos operculados e não embrionados, 33 ± 1 (31-34) de comprimento por 18 ± 1 (15-21) de largura, de coloração amarelo-parda. Poro genital localizado acima da ventosa ventral. Vesícula excretora em forma de X, com par de braços posteriores e anteriores, pós e pré-testiculares, respectivamente. Vitelária folicular distribuída bilateralmente entre a faringe e a parte posterior dos testículos. Poro excretor terminal.

Os parasitos adultos foram encontrados no terço proximal do intestino delgado dos três camundongos infectados experimentalmente com 201, 208 e 203 metacercárias maduras, sendo recuperando 175, 135 e 138 exemplares, respectivamente. Após a realização de exames parasitológicos de fezes pelo método de sedimentação espontânea, só um roedor infectado eliminou ovos nas fezes no sétimo DPI, sendo encontrado entre 1 a 2 ovos por lâmina avaliada.

Na tabela 3 são representados os dados morfométricos das formas adultas recuperadas no presente trabalho e outros relatados por diferentes autores.

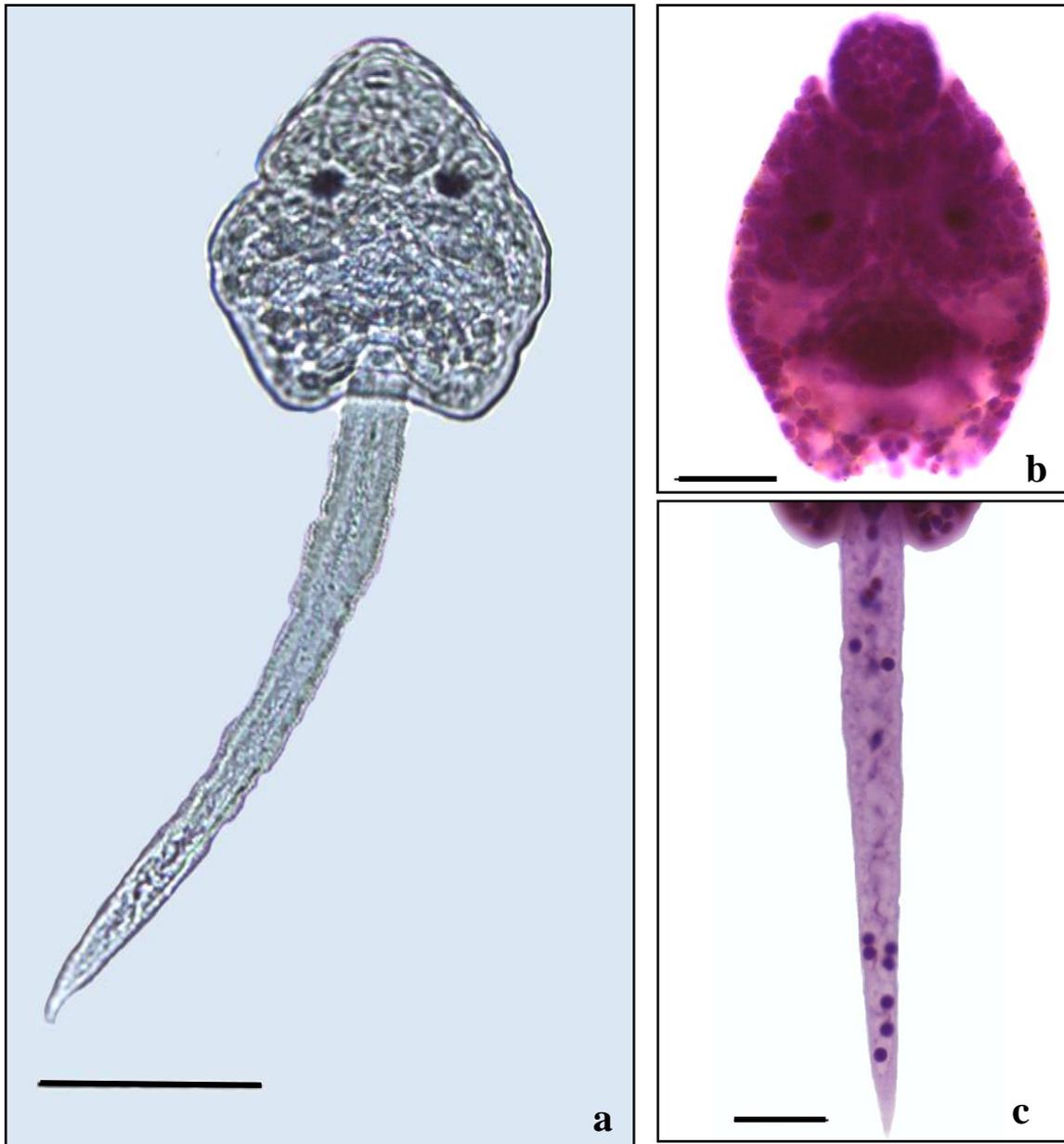


FIGURA 6 - *Centrocestus formosanus* - Cercária do tipo Pleurolofocerca emergida de exemplares de *Melanoides tuberculata* coletados na *Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla* e no *Refugio Silvestre Pantanos de Villa*, Peru. (a) Larva corada pelo sulfato azul de Nilo. (b) Detalhes do corpo e (c) cauda em cercária corada pelo carmím acético. Escala = 50 μ m (a); 20 μ m (b, c).

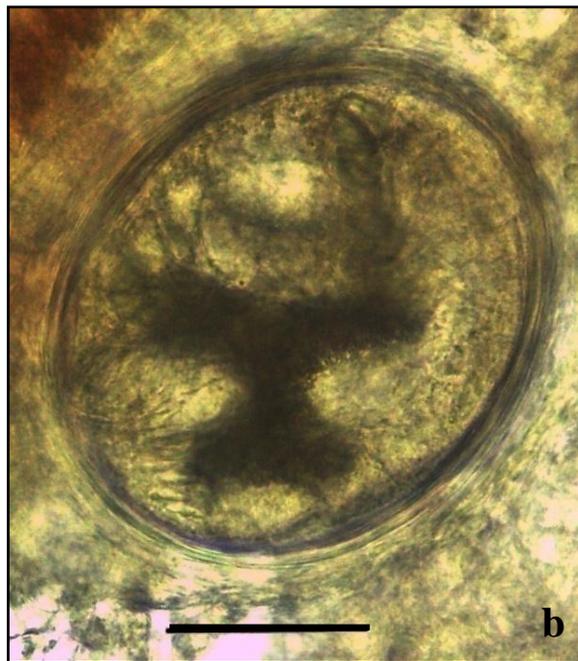
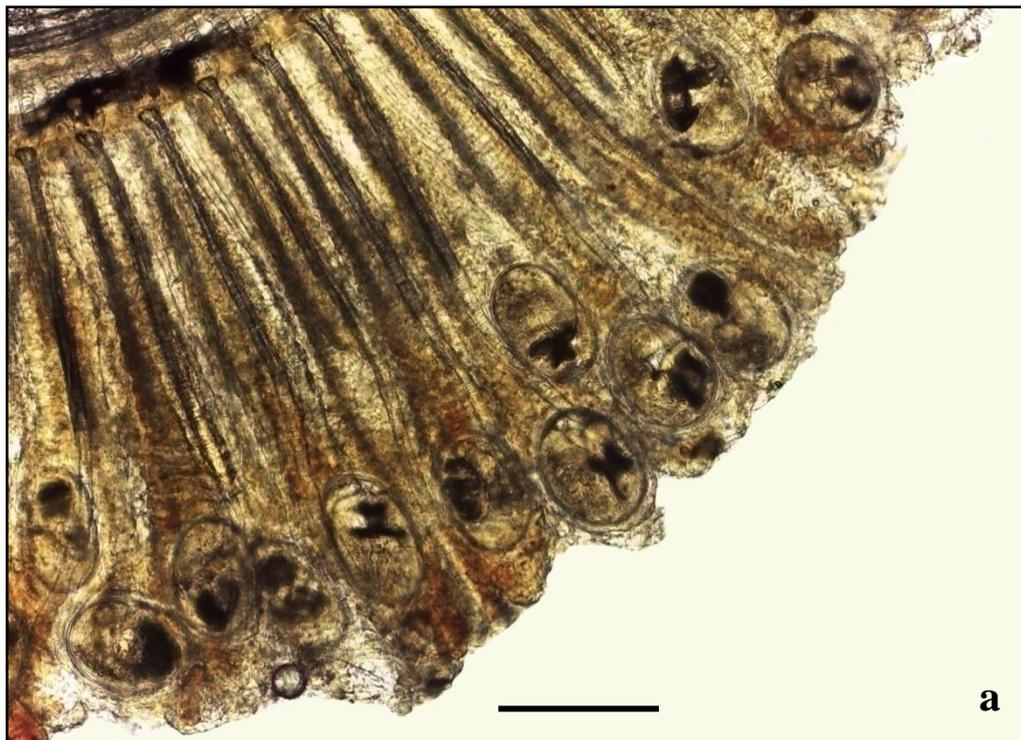


FIGURA 7 - *Centrocestus formosanus* – metacercárias recuperadas de exemplares de *Poecilia reticulata* infectados experimentalmente com cercárias do tipo *Pleurolofocerca* emergidas de *Melanoides tuberculata* oriundos do *Refugio Silvestre Pantanos de Villa*, Peru. (a) Metacercárias maduras localizadas nos filamentos branquiais após 30 dias de infecção, (b) detalhe da vesícula excretora em X. Escalas = 200 μ m (a); 50 μ m (b).

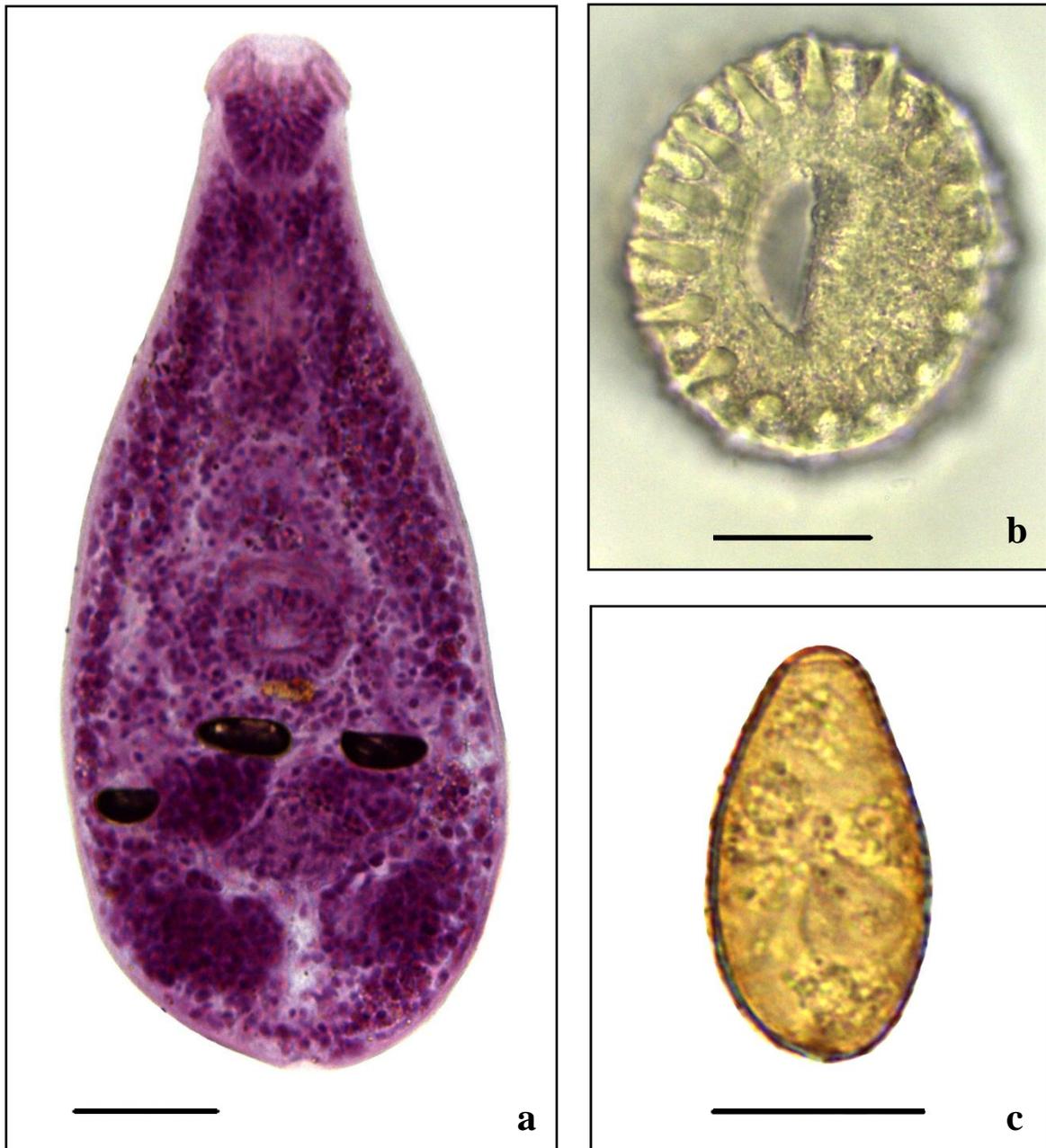


FIGURA 8 - *Centrocestus formosanus* – (a) Adulto recuperado do terço proximal do intestino delgado de camundongos, 7 dias após a infecção com metacercárias obtidas experimentalmente em *Poecilia reticulata* infectados por cercárias do tipo *Pleurolofocerca* emergidas de exemplares de *Melanoides tuberculata* coletados no *Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa*, Peru. Coloração: Carmím acético. (b) Detalhe da dupla coroa de acúleos aciculares, com vista apical. (c) Ovo obtido no exame parasitológico pelo método de sedimentação espontânea, no sétimo dia de infecção. Escala: 50 μ m (a); 20 μ m (b, c).

Tabela 3 - Dados morfométricos de forma adulta de *Centrocestus formosanus* obtidos no presente trabalho e medidas obtidas descritas por diferentes autores.

Referência	Presente estudo	Pinto & Melo, 2010a	Nishigori, 1924	Chen, 1942	Arizmendi-espinoza, 1992	Hernández <i>et al.</i> , 2003	Velásquez <i>et al.</i> , 2006
Localidade	Pântanos de Villa, Lima, Peru	Belo Horizonte, MG, Brasil	- Taiwan	- China	Teontepec de Aldama, Hidalgo, México	Aguasanta e Yaguaracual, Sucre, Venezuela	Medellín, Colômbia
Hospedeiro	<i>Mus musculus</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Nycticorax nycticorax</i>	<i>Rattus rattus</i>	<i>Gallus gallus domesticus</i>	<i>Rattus rattus</i>	<i>Gallus gallus domesticus</i>
	N	30	15	20	10	-	24
Corpo	C	288-418 (362)	232-479 (322)	289-389	314-572 (461)	240-326 (248)	232-469
	L	137-192 (158)	184-279 (214)	187-238	171-242 (212)	101-146 (119)	106-237
Vo	C	33-43 (37)	47-67 (58)	50	60	30-37 (32)	29-67
	L	18-26 (23)	33-49 (44)	47	56	33-48 (40)	32-61
E	N	32	32	32	30-36	32	32
Fa	C	41-50 (45)	27-36 (30)	40-47	41	22-37 (30)	26-40
	L	34-43 (38)	16-24 (21)	20-35	42	18-30 (22)	21-37
Vv	C	31-43 (37)	44-60 (54)	35-42	52	30-41 (34)	26-53
	L	36-50 (46)	41-55 (48)	38-54	55	33-48 (40)	32-61
Td	C	28-41 (34)	33-55 (46)	37-57	71	26-48 (34)	29-57
	L	43-60 (51)	63-93 (77)	77-100	106	22-56 (32)	40-94
Te	C	29-41 (35)	36-60 (43)	35-55	74	20-48 (35)	26-59
	L	45-60 (52)	65-91 (77)	55-100	101	26-56 (39)	51-96
Ov	C	26-40 (31)	40-52 (45)	37-42	67	22-45 (30)	32-80
	L	43-60 (52)	67-101 (83)	50-62	83	22-45 (34)	34-110
O	C	31-34 (33)	32-37 (35)	33-40	32-39 (34)	22-33 (28)	21-40
	L	15-21 (18)	16-20 (18)	17-21	17-20 (19)	15-22 (17)	14-18
							350-370 (370)
							125-150 (192)
							37-53 (46)d
							-
							33-38 (37)
							31-35 (33)
							53d
							-
							48d
							-
							-
							24-39 (35)
							15-23 (19)

5.2.2 *Haplorchis pumilio*

5.2.2.1 Posição taxonômica

Filo: Platyhelminthes Gegenbaur, 1859

Classe: Trematoda Rudolphi, 1808

Subclasse: Digenea Carus, 1863

Ordem: Opisthorchiida La Rue, 1957

Superfamília: Opisthorchioidea Looss, 1899

Família: Heterophyidae Leiper, 1909

Subfamília: Haplorchinae Looss, 1899

Gênero: *Haplorchis* Looss, 1899

Espécie: *H. pumilio* (Looss, 1896)

5.2.2.2 Caracterização morfológica e morfométrica

Cercárias (figura 9) (n=30): larvas do tipo Parapleurolofocerca. Corpo, 200 ± 4 (192-206) de comprimento por 76 ± 4 (69-82), coberto com fileiras de espinhos, sendo conspícuos principalmente na região anterior. Grupamentos de células cistogênicas distribuídas em todo o corpo. Cauda simples, 441 ± 12 (411-459) de comprimento por 27 ± 2 (21-27) de largura, apresentando duas membranas natatórias laterais no primeiro terço, seguido de outras duas membranas, uma com disposição dorsal e outra ventral. Ventosa oral subterminal e protrusível, 37 ± 1 (34-40) de comprimento por 34 ± 1 (33-36) de largura, com três fileiras de 8, 7 e 6 espinhos alongados e triangulares, no lóbulo pré-oral. Presença de dois ocelos arredondados, sendo evidenciados em alguns exemplares, em número de 3. Ventosa ventral ausente. Pré-faringe alongada, seguida de uma faringe arredondada, 10 (10-12) de comprimento por 13 ± 1 (12-14) de largura. Bifurcação do esôfago e os cecos intestinais não evidentes pela sobreposição das glândulas de penetração. Essas últimas possuem apresentam formato rectangular, com núcleo evidente e estão presentes em dois grupos de 7. São distribuídas entre a faringe e a parte posterior do corpo. Vesícula excretora circular epitelial, localizada na parte posterior do corpo.

A emergência das larvas dos moluscos infectados foi dependente da presença da luz. Uma hora após de fotoestimulação artificial, o molusco eliminou entre 60 a 80 cercárias, sem essa condição, apenas observaram-se 5-10 larvas. As cercárias realizaram intensa movimentação na água, cujo padrão foi em *zig-zag* e alternados com momentos de repouso de curta duração. Permaneceram vivas na água por até 48 horas após terem emergido..

Metacercárias (Figura 10): Cistos circulares ou ovais, de cor marrom clara, encontrados na base das aletas dos peixes infectados experimentalmente com cercárias. Dois ou três dias após infecção foi possível observar a presença de metacercárias imaturas com ocelos evidentes. Metacercárias imaturas (n=3) recuperadas de peixes com apenas 5 dias de infecção, mediram 112-115 de comprimento por 96-102 de largura. Metacercárias maduras (n=4) obtidas a partir de peixes com 35 dias de infecção, medindo 173-187 de comprimento por 166 - 179 de largura, cobertas por uma parede cística fina. Internamente, continham a larva que possui tegumento espinhoso, com complexo ventrogenital evidente, onde está localizada a ventosa ventral armada com espinhos pequenos triangulares. Vesícula excretora evidente, arredondada ou circular, com pigmentos de cor preta em seu interior.

Adultos (Figura 11) (n=19): Corpo alongado e piriforme, 388 ± 34 (343-446) de comprimento por 168 ± 10 (151-192) de largura, com tegumento espinhoso e região posterior arredondada. Ventosa oral subterminal, 45 ± 5 (36-52) de comprimento por 48 ± 3 (45-53) de largura, sem espinhos aciculares. Pré-faringe evidente, seguida da faringe muscular, 33 ± 2 (29-38) de comprimento por 20 ± 2 (17-22) de largura. Esôfago com comprimento de 67 ± 6 (59-77), cuja bifurcação é pré-equatorial e cecos intestinais estendidos até a região anterior do ovário. Complexo ventrogenital oval, 47 ± 6 (38-64) de comprimento por 61 ± 9 (36-71) de largura. Localiza-se após a bifurcação esofágica e contém internamente a ventosa ventral, saco genital e o poro genital. A ventosa ventral, com 34 ± 4 (28-41) de comprimento por 37 ± 2 (34-41) de largura, é reduzida e armada com 32 a 34 espinhos pequenos e triangulares. Testículo único, esférico ou oval, localizado na parte posterior do corpo, 61 ± 5 (48-71) de comprimento por 62 ± 5 (52-69) de largura. Vesícula seminal bipartita e bolsa do cirro ausente. Ovário oval, com 34 ± 3 (29-38) de comprimento por 49 ± 3 (43-53) de largura, pré-testicular, medial ou levemente dextral. Receptáculo seminal esférico ou oval, localizado do lado direito do ovário. Útero sinuoso, formando três alças, que ocupam o espaço entre a terminação posterior do corpo e o complexo ventrogenital. Ovos embrionados de cor amarela, 31 ± 2 (28-34) de comprimento por 17 ± 1 (15-19) de largura. Vitelária constituída por pequenos folículos presentes na área testicular. Poro excretor terminal.

Os parasitos adultos foram recuperados do terço distal do intestino delgado. Após infecção experimental de um camundongo com 59 metacercárias maduras, recuperaram-se aos 7 DPI, 41 exemplares. Não foram encontrados ovos do parasito durante os exames parasitológicos de fezes realizados neste roedor.

Os dados morfométricos dos parasitos adultos obtidos, juntamente com medidas registradas para *Haplorchis* spp por outros autores, são apresentados na tabela 4.



FIGURA 9 - *Haplorchis pumilio* – Cercárias do tipo Parapleurolofocerca emergidas de exemplares de *Melanoides tuberculata* coletados no Refugio Silvestre Pantanos de Villa, Peru. (a, b, c) Larva corada pelo sulfato azul de Nilo. (b) Em detalhe a distribuição das glândulas de penetração e a vesícula excretora circular. (c) Disposição das membranas natatórias na cauda. Escala: 100 μ m (a); 50 μ m (b, c).

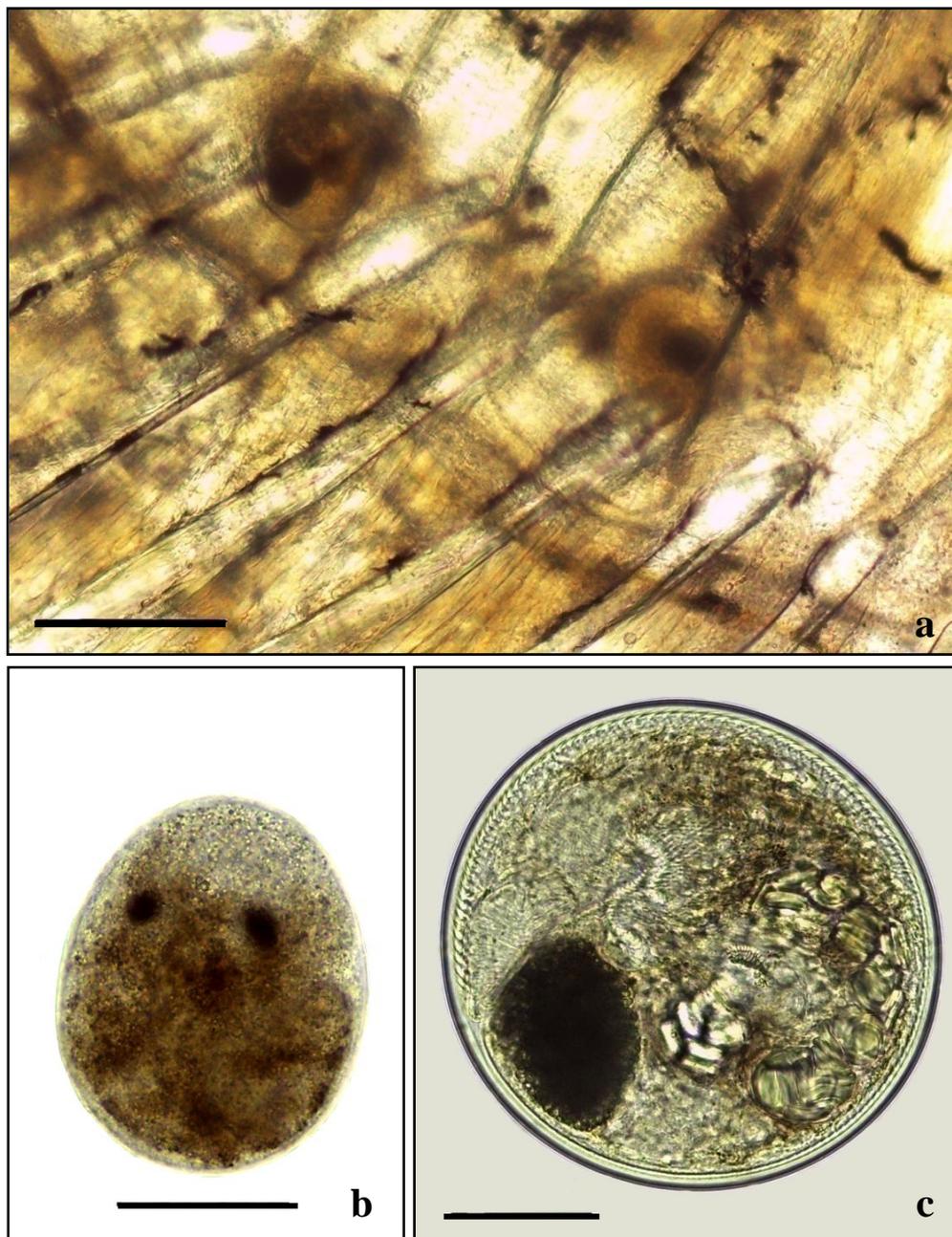


FIGURA 10 - *Haplorchis pumilio* – Metacercárias recuperadas de *Poecilia reticulata* experimentalmente infectado por cercárias emergidas de exemplares de *Melanoides tuberculata* coletados no *Refugio Silvestre Pantanos de Vila*, Peru. (a, c) Metacercárias maduras obtidas na base da aleta caudal de peixes com 35 dias após infecção. (b) Metacercária imatura recuperada 3 dias após infecção. Escalas: 200 μ m (a); 50 μ m (b, c).



FIGURA 11 - *Haplorchis pumilio* – Adulto recuperado do terço distal do intestino delgado de *Mus musculus*, após 7 dias de infecção com metacercárias obtidas de exemplares de *Poecilia reticulata* experimentalmente infectados com cercárias emergidas de espécimes de *Melanoides tuberculata* coletados no Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa, Peru. (a) Parasito corado pelo Carmím acético, (b) detalhe da região anterior e (c) posterior de parasito vivo. Escala: 50 μm .

Tabela 4 - Dados morfométricos de forma adulta de *Haplorchis* spp. transmitidos por *Melanoides tuberculata* registrados por diferentes autores. d: diâmetro.

		<i>Haplorchis pumilio</i>				<i>Haplorchis taichui</i>		
Referência		Presente estudo	Umadevi & Madhavi, 2006	Díaz <i>et al.</i> , 2008	Scholz <i>et al.</i> , 2001	Chen, 1936	Chen, 1936	Martin, 1958
Localidade		Pântano de Villa, Lima, Peru	Índia	Agua Blanca, Sucre, Venezuela	México	China	China	Havaí, Estados Unidos
Hospedeiro		<i>Mus musculus</i>	<i>Ardeola grayii</i> e <i>Bubulcus íbis coromandus</i>	<i>Cairina moschata</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Felis catus</i> e <i>Canis familiaris</i>	<i>Felis catus</i> e <i>Canis familiaris</i>	<i>Felis silvestris catus</i>
	N	-	-	20	3	9	9	20
Corpo	C	343-446 (388)	320-400 (359)	365-517	350-520	320-950 (636)	580-760 (660)	201-353 (280)
	L	151-192 (168)	140-200 (173)	121-192	180-210	165-360 (295)	270-420 (320)	155-263 (210)
Vo	C	36-52 (45)	32-56 (40)	40-53	40-52	-	60d	25-37 (31)d
	L	45-53 (48)	36-40 (40)	48-67	35-57	-	-	-
Fa	C	29-38 (33)	24-40 (31)	26-40	32-40	28	32	25-37 (31)
	L	17-22 (20)	16-20 (20)	18-29	32-35	29	27	19-28 (23)
E	C	59-77 (67)	83-86	48-107	-	-	9	53-87 (67)
Cv	C	38-64 (47)	36-44 (46)	54-75	-	-	-	-
	L	36-71 (61)	36-60 (45)	40-67	-	-	-	-
Espinhos-Cv	N	32-34	30-34	36-40	30-36	-	-	-
Vv	C	28-41 (34)	-	37-58	37-52	-	-	-
	L	34-41 (37)	-	30-52	40-52	-	-	-
T	C	48-71 (61)	52-70 (62)	56-83	60-80	120d	110	53-87 (67)
	L	52-69 (62)	45-70 (55)	59-102	67-105	-	85	53-74 (62)
Ov	C	29-38 (34)	40-44 (42)	26-61	30-50	70	85d	-
	L	43-53 (49)	36-44 (40)	32-67	57-68	46	-	-
O	C	28-34 (31)	36-40 (37)	26-34	29-32 (31)	25-32	27-32 (30)	23-26 (24)
	L	15-19 (17)	16-20 (17)	13-18	17-20 (19)	14-18	14-18 (16)	11-14 (12)

5.2.3 *Philophthalmus gralli*

5.2.3.1 Posição taxonômica

Filo: Platyhelminthes Gegenbaur, 1859

Classe: Trematoda Rudolphi, 1808

Subclasse: Digenea Carus, 1863

Ordem: Echinostomida La Rue, 1957

Superfamília: Echinostomatidea Looss, 1899

Família: Philophthalmidae Looss, 1899

Subfamília: Philophthalminae Looss, 1899

Gênero: *Philophthalmus* Looss, 1899

Espécie: *P. gralli* Mathis & Leger, 1910

5.2.3.2 Caracterização morfológica e morfométrica

Cercárias (figura 12) (n=20): larvas do tipo Megalura. Corpo espinhoso, 487 ± 41 (411-548) de comprimento por 156 ± 15 (130-178) de largura, com tegumento coberto de papilas sensoriais (quantidade não determinada). Numerosas células cistogênicas distribuídas em todo o corpo. Cauda simples, 562 ± 37 (493-651) de comprimento por 37 ± 3 (34-41) de largura, com extremidade terminal levemente arredondada ou plana, onde foi possível observar as glândulas adesivas. Ventosa oral subterminal, 57 ± 3 (52-62) de comprimento por 47 ± 2 (43-50) de largura, seguida da pré-faringe, faringe, esôfago e cecos intestinais, cujas terminações localizam-se na parte anterior da vesícula excretora. Ventosa ventral equatorial, 61 ± 3 (55-64) de comprimento por 63 ± 2 (60-67) de largura, com constrição do corpo nesse nível, sendo a região pré-acetabular a que apresenta a maior largura. Vesícula excretora oval ou esférica, localizada na parte posterior do corpo. Primórdio genital formado por uma massa alongada de células não diferenciadas, estendido desde a bifurcação dos cecos intestinais até a região anterior da vesícula excretora.

O movimento das cercárias do tipo Megalura é principalmente dirigido pelo corpo, de um lado para outro. As larvas, após emergência, encistam-se rapidamente nas paredes do poço da placa de poliestireno ou na mesma concha do molusco infectado. É por isso que a visualização das cercárias com ou sem corantes vitais tende a ser difícil, uma vez que as larvas se encistam na lâmina.

Metacercárias (figura 13) (n=20): Cisto com formato piriforme, 354 ± 9 (336-368) de comprimento por 182 ± 5 (171-188) de largura. Contém a larva, com tegumento coberto de espinhos e apresentando alta atividade após ser desencistado termicamente.

Adultos (figura 14) (n=25): Corpo alongado, 3733 ± 759 (2544-4950) de comprimento por 1323 ± 148 (1031-1615) de largura. Ventosa oral subterminal e oval, 266 ± 43 (199-356) de comprimento por 357 ± 34 (308-425) de largura. Pré-faringe pouco evidente, seguida da faringe muscular, 309 ± 35 (240-425) de comprimento por 355 ± 35 (288-425) de largura. Esôfago curto com bifurcação pré-acetabular. Cecos intestinais estendendo-se até a terminação posterior do corpo. Ventosa ventral pré-equatorial, esférica e muscular, 518 ± 41 (425-583) de comprimento por 502 ± 36 (411-555) de largura. Relação ventosa oral/ventosa ventral $1,4 \pm 0,1$ (1,2-1,6). Apresentam dois testículos ovais, lisos ou levemente lobados, em tandem, localizados no último terço do corpo. Testículo anterior, 433 ± 85 (274-603) de comprimento por 649 ± 78 (521-788) de largura. Testículo posterior, 455 ± 117 (274-672) por 455 ± 92 (446-733). Vesícula seminal oblíqua ou alongada, localizada no nível da ventosa ventral ou levemente posterior. Bolsa do cirro oblíqua e alongada. Ovário pré-testicular, circular a oval, 194 ± 38 (137-288) de comprimento por 249 ± 30 (185-315) de largura. Útero alongado, com numerosos ovos em diferentes estágios de desenvolvimento, formando voltas entre a ventosa ventral e o testículo anterior. Receptáculo seminal oval e próximo ao ovário, ocupando a primeira porção do útero, sendo notório em alguns exemplares. Ovos embrionados, contendo miracídio com ocelo evidente, localizados na região distal do útero, 68 ± 4 (62-77) de comprimento por 32 ± 2 (29-32) de largura. Poro genital localizado ao nível da bifurcação esofágica. Vitelária tubular, localizada entre a ventosa ventral e o testículo anterior, ocupando aproximadamente 30% do corpo em extensão. Vesícula excretora com dois braços que percorrem lateralmente o corpo até a faringe. Poro excretor terminal.

Dos dois exemplares de *G. g. domesticus* infectados por 20 metacercárias, recuperou-se aproximadamente 50% dos parasitos 35 DPI, de ambos os olhos. Além disso, antes da necropsia das aves, realizou-se lavado ocular com soro fisiológico das aves infectadas e foi possível evidenciar ovos em grandes quantidades e a rápida eclosão do miracídio.

Os dados morfométricos do estágio adulto do trematódeo são apresentados na tabela 5, assim como os dados de *Philophthalmus* spp. obtidos por outros autores.



FIGURA 12 - *Philophthalmus gralli* – Cercárias do tipo Megalura emergidas de exemplares de *Melanoides tuberculata* coletados na Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla e no Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa. (a) Larva a fresco. (b) Detalhe do primórdio genital, esôfago e cercos intestinais em cercária corada pelo carmim acético. Escala: 50 μ m (a, b).



FIGURA 13 - *Philophthalmus gralli* – (a) Metacercária encistada na superfície de uma lâmina de vidro em que foi adicionada cercária do tipo Megalura emergida de *Melanoides tuberculata* coletado no Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa, Peru. (b) Metacercária mecanicamente desencistada corada pelo vermelho neutro. Escala: 100 µm (a); 50 µm (b).

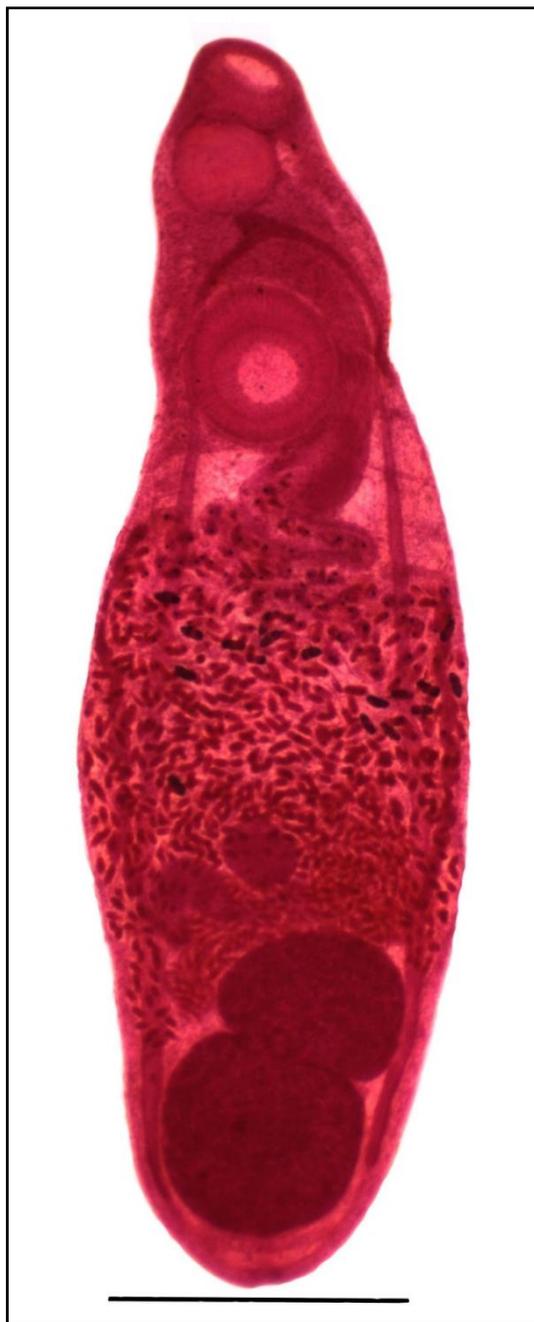


FIGURA 14 - *Philophthalmus gralli* – Forma adulta recuperada da membrana nictitante de *Gallus gallus domesticus* 35 dias após infecção com metacercárias obtidas a partir de cercárias do tipo *Megalura* emergidas de exemplares de *Melanoides tuberculata* coletados no Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa. Escala: 1000 μm .

Tabela 5 - Dados morfométricos de adultos de *Philophthalmus gralli* obtidos no presente estudo e de outros registros de *Philophthalmus* spp. na América do Sul.

		<i>Philophthalmus gralli</i>				<i>P. lachrymosus</i>		<i>P. semipalmatus</i>
		Presente trabalho	Pinto & Melo, 2010b	Díaz <i>et al.</i> , 2002	Literák <i>et al.</i> , 2013	Freitas, 1955	Pinto <i>et al.</i> , 2005	Nasir & Díaz, 1972
Localidade		Pântanos de Villa Lima, Peru	Belo Horizonte MG, Brasil	Aguasanta & Yaguaracal, Venezuela	Pântanos de Villa Lima, Peru	Manguinhos RJ, Brasil	Foz de Iguaçu PR, Brasil	Laguna Del Peñon, Venezuela
Hospedeiro		<i>Gallus gallus domesticus</i>	<i>G. gallus domesticus</i>	<i>G. gallus domesticus</i>	<i>Trachuris rubrigastra</i>	<i>Ardea alba</i>	<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>	<i>Tringa semipalmata</i>
	N	25	13	25	-	6	10	-
Corpo	C	2.544-4.950 (3733)	3.100-4.070 (3610)	2564-3384	1800-2430 (2110)	4190-4620	3400-4250 (3730)	2624-4475
	L	1031-1615 (1323)	860-1210 (1020)	512-1205	670-1430 (960)	1380-1640	850-1530 (1080)	960-1794
Vo	C	199-356 (265)	316-339 (330)	237-297	240-320 (278)	300-310	220-290 (260)	216-363
	L	247-425 (354)	374-421 (401)	287-378	280-380 (319)	360-430	260-330 (300)	253-435
Vv	C	425-583 (518)	479-542 (514)	388-544	360-480 (410)	610-690	610-720 (670)	917
	L	411-555 (502)	442-484 (464)	409-505	370-490 (420)		630-770 (700)	958
Vo/Vv		1:1,2-1,6	1:1-1,22	1:1-1,3	1:1,12-1,66	1:1-2	1:1-2	1:1-2,75
F	C	240-377 (309)	279-316 (299)	227-323	230-350 (287)	310-350	190-210 (200)	225-333d
	L	288-425 (355)	326-358 (339)	227-333	170-290 (210)	380-460	90-150 (110)	-
Ov	C	137-288 (194)	211-258 (237)	126-222	87-175 (102)	200-210	150-280 (190)	188-394d
	L	185-315 (249)	245-300 (266)	151-252	87-224 (140)	180-220	150-290 (210)	-
Ta	C	274-603 (433)	179-263 (222)	272-378	170-370 (255)	360-480	140-270 (230)	188-297
	L	521-788 (649)	279-453 (403)	424-530	280-430 (372)	460-550	280-460 (370)	206-563
Tp	C	274-672 (455)	174-247 (216)	272-464	84-92 (89)	380-480	150-360 (280)	188-454
	L	446-733 (602)	268-421 (351)	404-505	70-92 (82)	450-530	280-470 (360)	216-669
O	C	62-77 (68)	60-87 (73)	74-80	87-93 (90)	94-97	90-110 (100)	60-69
	L	29-38 (32)	27-36 (32)	25-35	35-37 (36)	38-42	21-40 (30)	18-30
V		Tubular	Tubular	Tubular	Folicular	Folicular	Folicular	Folicular

5.2.4. *Renicola* sp.

5.2.4.1 Posição taxonômica

Filo: Platyhelminthes Gegenbaur, 1859

Classe: Trematoda Rudolphi, 1808

Subclasse: Digenea Carus, 1863

Ordem: Plagiorchiida La Rue, 1957

Superfamília: Microphalloidea Ward, 1901

Família: Rencolidae Dollfus, 1939

Gênero: *Renicola* Cohn, 1904

Espécie: *Renicola* sp.

5.2.4.2 Caracterização morfológica e morfométrica

Cercárias (Figura 15) (n=30): Larvas do tipo Gimnocéfala. Corpo alongado, de formato lanceolado, com tegumento espinhoso, medindo 361 ± 15 (315-377) de comprimento por 110 ± 7 (103-123) de largura. Possui numerosas células cistogênicas, que fornecem ao parasito uma coloração parda. Ventosa oral subterminal e sem estilete, 38 ± 6 (34-55) de comprimento por 28 ± 1 (26-29) de largura. Faringe pequena, 9 ± 1 (9-12) de comprimento por 10 ± 1 (9-10) de largura. Ventosa ventral equatorial, 33 ± 1 (29-34) de comprimento por 33 ± 1 (29-34) de largura. Primórdio genital pequeno, de formato irregular e pré-acetabular. Cauda simples, 297 ± 17 (267-329) de comprimento por 33 ± 2 (27-34) de largura. Vesícula excretora em forma de Y, cujos braços estendem-se próximos à área pré-acetabular.

Realizou-se infecção experimental de 15 exemplares de *P. reticulata* com 50 a 100 cercárias emergidas do tiarídeo estudado no presente trabalho. Aos 15 DPI, não foram encontradas metacercárias nos peixes.

Na tabela 6 são apresentados os dados morfométricos da cercária de *Renicola* sp. encontrada no presente estudo e os dados obtidos do mesmo estágio evolutivo encontrado em *M. tuberculata* por outros pesquisadores.



FIGURA 15 - *Renicola* sp. – Cercária do tipo Gimnocéfala emergida de exemplares de *Melanoides tuberculata* coletados na Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla e no Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa. (a) Larva corada pelo azul de sulfato de Nilo. (b) Corpo da cercária corada pelo carmim acético, com detalhe da vesícula excretora, ventosa ventral e o primórdio genital pré-acetabular. Escala: 200 μ m (a); 50 μ m (b).

Tabela 6 - Dados morfométricos de cercárias de *Renicola* sp. emergidas de exemplares de *Melanoides tuberculata* coletados no *Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa* comparados com medidas de larvas semelhantes relatadas também neste tiarídeo por diferentes autores.

Refêrencia	<i>Renicola</i> sp.	<i>Renicola</i> sp.	<i>Cercaria</i> sp. 1	<i>Cercaria tandani</i>	<i>Cercaria indica</i> XIV	<i>Cercaria leyteensis</i> 10	<i>Cercaria levantina</i> 9	
	Presente estudo	Pinto & Melo, 2012b	Vergara & Velásquez, 2009	Saxena, 1982	Haseeb, 1980	Ito, 1977	Gold & Lengy, 1974	
Localidade	Peru	Brasil	Colômbia	Índia	Paquistão	Filipinas	Israel	
Corpo	C	315-377 (361)	253-328 (301)	235-408 (301)	300-450	255-400 (350)	260-340 (292)	205-625
	L	103-123 (110)	102-130 (112)	110-157 (138)	150-200	55-85 (75)	100-130 (114)	84-200
Ca	C	267-329 (297)	205-253 (235)	173-243 (200)	270-370	100-185 (150)	150-250 (195)	150-400
	L	27-34 (33)	25-35 (31)	31-47 (40)	45-60	-	35-50 (37)	38-54
Vo	C	34-55 (38)	25-32 (28)	24-55 (37)	40-48	30-35 (32)	30-35 (33)	35-50
	L	26-29 (28)	22-28 (26)	24-47 (36)	-	30-35 (32)	40-50 (44)	-
F	C	9-12 (9)	8-12 (10)	-	8-12	10	15-17 (16)	14-18
	L	9-12 (10)	7-10 (9)	-	-	10	18-22 (20)	-
Vv	C	29-34 (33)	25-30 (27)	24-47 (35)	40-48	25-28 (25)	35-40 (38)	37-55
	C	29-34 (33)	25-30 (27)	24-39 (35)	-	25-28 (25)	40-45 (43)	-

5.3 Análise molecular

A amplificação de sequências parciais do gene 18S rRNA dos trematódeos transmitidos por *M. tuberculata* no Peru e no Brasil realizada no presente estudo possibilitou a obtenção de fragmentos entre 557 pb e 562 pb para todas as amostras avaliadas. As análises moleculares realizadas confirmaram a identificação morfológica de todas as quatro espécies de trematódeos encontradas, conforme apresentado abaixo.

Os resultados obtidos para as amostras de *C. formosanus*, *P. gralli* e *Renicola* sp. revelaram não haver diferenças entre as sequências nucleotídicas para a região do gene avaliado entre as amostras do Peru e as provenientes do Brasil. Assim, para a construção da árvore filogenética, apenas foram consideradas as sequências obtidas dos trematódeos encontrados nas coleções aquáticas do litoral peruano e aquelas disponíveis no GenBank.

A árvore filogenética gerada pelo método de Máxima Verossimilhança é apresentada na figura 16. A comparação pareada entre as sequências moleculares obtidas e sequências de espécies relacionadas depositadas no GenBank é apresentada na tabela 7. As espécies foram consideradas resolvidas de acordo com a topologia da árvore filogenética obtida e por apresentar distância mínima interespecífica maior que a máxima intraespecífica (quando disponível).

A topologia da árvore obtida revela a presença de três clados que correspondem às famílias de trematódeos nas quais estão incluídas as espécies encontradas no presente estudo: Heterophyidae (*H. pumilio* e *C. formosanus*), Philophthalmidae (*P. gralli*) e Rencolidae (*Renicola* sp.). Considerando-se apenas as sequências obtidas no presente estudo, a diferença molecular para a região 18S entre as espécies destas três diferentes famílias variou entre 4,61% e 6,92%.

Em relação aos dois gêneros pertencentes à família Heterophyidae (*Centrocestus* e *Haplorchis*) transmitidos por *M. tuberculata*, a diferença intergenérica entre os diferentes isolados e espécies considerados na análise variou entre 1,89% e 3,14%, sendo a diferença entre as amostras de *C. formosanus* e *H. pumilio* do Peru de 2,31%. Quanto a *C. formosanus*, o isolado obtido no presente estudo agrupou-se com amostras provenientes de Tailândia e dos EUA, revelando-se 100% de similaridade com o isolado asiático e uma variação intraespecífica de apenas 0,21% (1pb) com o isolado norte-americano. Outro isolado, encontrado em Israel identificado apenas até o nível de gênero (*Centrocestus* sp.) agrupou-se

com as amostras de *C. formosanus*, entretanto a topologia do ramo e a diferença molecular observada (1,47%) sugerem que se trata de uma espécie distinta.

A análise filogenética realizada revelou que *H. pumilio* obtido no Peru forma um clado com isolados coespecíficos provenientes da Tailândia (100% de similaridade) e Israel (variação intraespecífica de 0,63%). Além disso, os resultados revelaram que, para o marcador molecular utilizado, as diferenças entre as três espécies do gênero *Haplorchis* são comparativamente menores (entre 0,63% e 1,68%). De fato, a diferença entre o isolado peruano de *H. pumilio* em relação a *H. taichui* e *H. yokogawai* foi de 0,84% e 1,05 % respectivamente. Além disso, um isolado identificado como *Procerovum varium*, gênero pertencente à mesma subfamília, agrupou-se no clado contendo as espécies do gênero *Haplorchis*, com uma diferença de apenas 0,21% em relação a *H. taichui* e 1,05 % em relação ao isolado sul-americano de *H. pumilio*. Nesse sentido, a possibilidade deste isolado identificado como *P. varium* tratar-se de um caso de identificação equivocada (possivelmente de *H. taichui*) não pode ser descartada.

A amostra de *P. gralli* formou um clado com um isolado da mesma espécie proveniente do mesmo país. Entretanto, foi verificada uma variação entre estes dois isolados simpátricos de 0,84%. Estas amostras de *Philophthalmus* também se agruparam com um isolado marinho de origem australiana identificado como um representante da família Philophthalmidae (*Philophthalmid* sp.), sendo a diferença molecular em relação as amostras peruanas de 1,05% e 1,89%.

Finalmente, para *Renicola* sp., a ausência de sequências moleculares de espécies representantes do gênero de ambiente de água doce impossibilitaram avançar na identificação específica do parasito. Foi observado que, entre as amostras com sequências disponíveis no GenBank, o isolado que apresentou maior similaridade foi uma amostra identificada como “metacercária não identificada”, encontrada no fígado de *Tilapia zillii* em Israel (diferença molecular de 1,68%). Entretanto, a amostra peruana formou um clado com um significativo suporte com isolados de duas espécies europeias de *Renicola* encontradas em ambiente marinho, *Renicola lari* (diferença molecular de 2,73%) e *Renicola* sp. (diferença molecular de 4,61%).

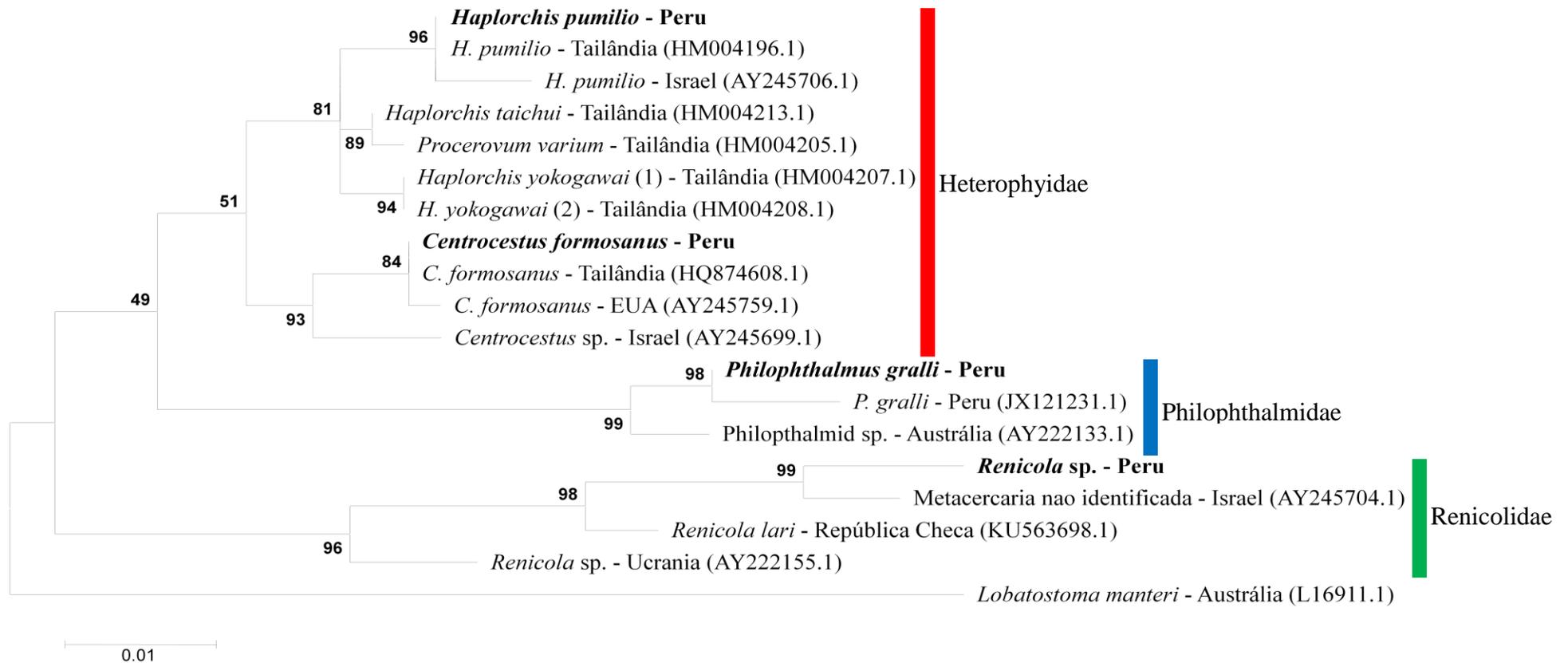


FIGURA 16 - Árvore filogenética demonstrando a relação entre sequências do gene nuclear 18S rRNA dos parasitos encontrados no presente estudo (em negrito), de material proveniente de *Melanoides tuberculata* da Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla e no Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa (Lima, Peru), com sequências depositadas no GenBank. As relações filogenéticas foram inferidas pelo método de Máxima Verossimilhança e o número demonstrando em cada ramo representa valores de Bootstrap (1000 repetições).

Tabela 7 - Comparação pareada (distância p não corrigida expressa em porcentagem) de região parcial do gene 18S rRNA entre espécies de trematódeos encontradas em *Melanoides tuberculata* no Peru e amostras de espécies relacionadas disponíveis no GenBank.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 <i>Centrocestus formosanus</i> – Peru																	
2 <i>C. formosanus</i> - Tailândia (HQ874608.1)	0,00																
3 <i>C. formosanus</i> - EUA (AY245759.1)	0,21	0,21															
4 <i>Centrocestus</i> sp. - Israel (AY245699.1)	1,47	1,47	1,26														
5 <i>Haplorchis pumilio</i> – Peru	2,31	2,31	2,52	2,52													
6 <i>H. pumilio</i> - Israel (AY245706.1)	2,94	2,94	3,14	3,14	0,63												
7 <i>H. pumilio</i> - Tailândia (HM004196.1)	2,31	2,31	2,52	2,52	0,00	0,63											
8 <i>H. yokogawai</i> - Tailândia (HM004208.1)	1,89	1,89	2,10	2,10	1,05	1,68	1,05										
9 <i>H. yokogawai</i> - Tailândia (HM004207.1)	1,89	1,89	2,10	2,10	1,05	1,68	1,05	0,00									
10 <i>H. taichui</i> - Tailândia (HM004213.1)	1,89	1,89	2,10	2,10	0,84	1,47	0,84	0,63	0,63								
11 <i>Procerovum varium</i> - Tailândia (HM004205.1)	2,10	2,10	2,31	2,31	1,05	1,68	1,05	0,84	0,84	0,21							
12 <i>Philophthalmus gralli</i> – Peru	5,03	5,03	5,03	4,61	4,61	5,24	4,61	4,61	4,61	4,61	4,82						
13 <i>P. gralli</i> - Peru (JX121231.1)	5,87	5,87	5,87	5,45	5,45	6,08	5,45	5,45	5,45	5,45	5,66	0,84					
14 Philophthalmid sp. - Austrália (AY222133.1)	4,40	4,40	4,40	4,82	4,40	5,03	4,40	4,40	4,40	4,40	4,61	1,05	1,89				
15 <i>Renicola</i> sp. – Peru	6,50	6,50	6,71	7,55	6,92	7,55	6,92	7,34	7,34	7,34	7,55	6,92	7,76	6,92			
16 <i>Renicola lari</i> - República Checa (KU563698.1)	5,03	5,03	5,24	5,45	4,82	5,45	4,82	5,24	5,24	5,24	5,45	6,50	7,34	6,50	2,73		
17 <i>Renicola</i> sp. - Ucrânia (AY222155.1)	4,61	4,61	4,82	4,82	4,61	5,24	4,61	4,19	4,19	4,19	4,40	6,29	7,13	6,50	4,61	2,73	
18 Met. não identificada - Israel (AY245704.1)	6,50	6,50	6,71	7,13	6,50	7,13	6,50	6,92	6,92	6,92	7,13	6,29	7,13	5,87	1,68	2,52	3,98

6 DISCUSSÃO

No Peru, *M. tuberculata* apresenta uma ampla distribuição, já tendo sido encontrado tanto em áreas do litoral como da Cordilheira dos Andes, contudo ainda não reportado na região amazônica (Paredes *et al.*, 1999). É considerada uma espécie invasora devido à adaptação a diferentes ambientes e pela alta taxa de reprodução, estando associada ao desaparecimento de alguns moluscos nativos em coleções de água doce do território peruano (Ramírez *et al.*, 2003). Estudos sobre o tiarídeo nesse país são escassos e relacionados, principalmente, à avaliação de apenas aspectos ecológicos (Vivar *et al.*, 1990; Iannacone *et al.*, 2003, 2013; Pino *et al.*, 2010).

Do ponto de vista parasitológico, sabe-se que *M. tuberculata* é o responsável, até o momento, pela transmissão de quatro espécies de trematódeos na América Latina, três destas são consideradas zoonóticas (Pinto & Melo, 2011). Apesar dessa informação, no Peru, até a realização do presente estudo, existia apenas um trabalho relatando a transmissão de trematódeos por este tiarídeo. Literák *et al.* (2013), após coletas de exemplares de *M. tuberculata* no *Refugio Silvestre Pantanos de Villa*, localizada na cidade de Lima, registraram pela primeira vez a transmissão de uma cercária pertencente à família Philophthalmidae e de outros dois tipos cercarianos não identificados pelos autores. Além disso, detectaram na membrana nictitante de um passeriforme, *Tachuris rubrigastra* (Vieillot, 1817), formas adultas de uma espécie do gênero *Philophthalmus*, parasito reconhecido pela sua importância médica e veterinária (Nollen & Kanev, 1995). Diante disso, *M. tuberculata* pode apresentar um papel importante na transmissão de parasitos que podem afetar a fauna de ambientes naturais do Peru, além de ter um potencial impacto na saúde de pessoas que frequentam as áreas pantanosas para realizar atividades recreativas e a pesca.

Assim, no presente estudo, realizaram-se 20 coletas de *M. tuberculata* em duas áreas pantanosas do Peru, a *Área de Conservación Regional Humadales de Ventanilla* e o *Refugio Silvestre Pantanos de Villa*, entre dezembro de 2015 e julho de 2016. Foi detectada a emergência de quatro tipos cercarianos: Gimnocéfala, Megalura, Parapleurolofocerca e Pleurolofocerca. Comparando-se os dados obtidos com os descritos por Literák *et al.* (2013), corrobora-se que o tiarídeo transmite uma cercária do tipo Megalura que pertence à família Philophthalmidae.

Adicionalmente, os autores descreveram o encontro de uma cercária do tipo *Pleurolofocerca*, que foi registrada também no presente estudo. Além disso, relataram a emergência de uma terceira cercária que, segundo os autores possivelmente pertence à família *Paramphistomidae*, contudo, larvas do tipo *Anfistoma* não foram encontradas no presente estudo nem por outros pesquisadores em diferentes localidades do continente americano. Por outro lado, o formato arredondado e posição terminal da vesícula excretora da cercária do tipo *Parapleurolofocerca*, podem ter induzido os autores a uma identificação errônea desta cercária como sendo uma larva do tipo *Anfistoma*.

A transmissão da cercária do tipo *Megalura* por *M. tuberculata* foi detectada nas duas coleções aquáticas avaliadas, mas com uma baixa taxa de infecção (0,17%) comparada com a obtida por Literák *et al.* (2013), que realizando um esforço amostral menor (744 exemplares) encontram um percentual de infecção de 31%. Sem dúvida, esta diferença é significativa, tendo em vista que no presente estudo foram realizadas coletas na área selecionada por esses pesquisadores (*Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa*). Por outro lado, os dados obtidos no presente estudo ajustam-se com os obtidos anteriormente por Díaz *et al.* (2002) e Pinto & Melo (2010b) no Brasil, que encontraram taxas de infecção inferiores a 5%.

Os estudos experimentais realizados a partir das cercárias do tipo *Megalura* emergidas do molusco possibilitaram a obtenção de formas adultas em *G. g. domesticus*, e assim a identificação do parasito como *P. gralli*. Atualmente, conhecem-se aproximadamente 40 espécies do gênero *Philophthalmus*, que são consideradas parasitos oculares de aves e mamíferos (entre eles, o homem), registrados em diferentes partes do mundo (Nollen & Kanev, 1995; Dailey *et al.*, 2005; Schuster, 2011). Na América Latina, foi descrita a ocorrência de quatro espécies: *P. gralli*, *P. lachrymosus* Braun, 1902, *P. semipalmatus* (Nasir & Díaz, 1972) e *P. zalophi* Dailey, Ellin & Parás, 2005, das quais, a primeira, invasora no continente americano, apresenta a maior distribuição geográfica. Além disso, estudos que consideram o desenvolvimento do ciclo experimental do parasito foram conduzidos durante os últimos anos na América do Sul, permitindo assim, a descrição dos diferentes estágios do parasito e a identificação morfológica baseada na morfologia das formas adultas (Díaz *et al.*, 2002; Pinto & Melo, 2010a).

Literák *et al.* (2013) registraram pela primeira vez a ocorrência de uma espécie identificada como *P. lucipetus* no Peru, assumindo que *P. gralli* seria sinônimo dessa espécie.

No entanto, as características morfológicas dos parasitos adultos obtidos em *T. rubrigastra* naturalmente infectados apresentadas pelos pesquisadores não correspondem a *P. lucipetus* nem a *P. gralli*, gerando a possibilidade de que se trataria de uma nova espécie. Apesar de estes autores terem avaliado a transmissão da larva do trematódeo por *M. tuberculata*, não consideraram a descrição da cercária nem a realização de estudos experimentais para se associar os parasitos encontrados em aves com as larvas obtidas nos moluscos. Do ponto de vista biológico, sabe-se que os hospedeiros intermediários de *P. gralli* e *P. lucipetus* são *M. tuberculata* e *Melanopsis praemorsa* (Linnaeus, 1758), respectivamente (Radev *et al.*, 1999). Estas questões taxonômicas relacionadas ao trabalho de Literák *et al.* (2013) foram discutidas por Pinto & Melo (2013b), e após isso, Heneberg (2013) reconheceu a espécie de *Philophthalmus* encontrada no Refugio Silvestre Pantanos de Villa, como *P. gralli*. Assim, novos estudos sobre o parasito transmitido por *M. tuberculata* em território peruano são importantes para se confirmar a identidade deste trematódeo ocular.

O estudo morfológico de parasitos adultos obtidos experimentalmente no presente estudo confirmou a transmissão de *P. gralli* por *M. tuberculata* no Peru. Os dados morfométricos apresentados são similares ao espécime descrito por Literák *et al.* (2013), com exceção do formato da vitelária. Segundo Heneberg (2013), esta diferença pode ser considerada irrelevante e não suficiente para estabelecer aquele isolado peruano de *Philophthalmus* como uma nova espécie. De fato, a análise molecular do gene parcial 18S rRNA realizada no presente estudo revelou que os dois isolados de *Philophthalmus* obtidos no Peru apresentam 99,2% de similaridade. Também, não há diferenças genéticas entre as sequências obtidas de amostras de *P. gralli* do Brasil e Peru avaliadas no presente estudo. Por outro lado, diferenças moleculares para outros marcadores (nucleares e mitocondriais) foram verificadas entre isolados identificados como *P. gralli* no Peru e na Costa Rica (Heneberg *et al.*, 2014). Assim, futuros estudos envolvendo outros marcadores moleculares e um número maior de isolados, poderão contribuir para o conhecimento da diversidade molecular de *P. gralli* introduzidos e mantidos por *M. tuberculata* na América do Sul. Frente a essa informação obtida, e tratando-se de um trematódeo com potencial zoonótico, a população que frequenta essas áreas pantanosas para lazer, fato observado durante as coletas malacológicas realizadas, deve ser alertada quanto ao o risco de se adquirir a parasitose ocasionada por estes helmintos.

A segunda cercária encontrada no presente trabalho pertence ao tipo *Pleurolofocerca*, cuja transmissão pelo tiarídeo foi detectada nas duas áreas naturais avaliadas. Verificou-se uma taxa de infecção geral de 1,5%, considerada menor quando comparada com a obtida por Pinto & Melo (2010b) no Brasil (7%). No Peru, Literák *et al.* (2013) descreveram a emergência de uma cercária desse tipo, com a suspeita de que pertenceria à família Heterophyidae, o que é confirmado neste estudo. Porém, a morfologia das larvas encontradas e dados obtidos a partir da realização do ciclo experimental para a obtenção de parasitos adultos, não foram apresentados por estes autores, impossibilitando a identificação do parasito até o nível de gênero e espécie.

Estudos experimentais a partir da larva do tipo *Pleurolofocerca*, permitiram a obtenção do verme adulto. Para isso, utilizou-se como segundo hospedeiro intermediário a *P. reticulata*, e *M. musculus*, como definitivo. A forma adulta recuperada foi identificada como *C. formosanus*, sendo esse é o primeiro registro dessa espécie para o Peru.

Existem diversos estudos ou relatos da cercária de *C. formosanus* em *M. tuberculata* no continente americano e realizaram estudos experimentais visando à obtenção e caracterização dos diferentes estágios evolutivos do parasito (Arizmendi-Espinosa, 1992; Hernández *et al.*, 2003; Velásquez *et al.*, 2006; Pinto & Melo 2010a; Paula-Andrade *et al.*, 2013; Ximenes *et al.*, 2016). A metacercária desse parasito se desenvolve a partir dessa cercária nas brânquias de peixes de água doce, e dependendo da quantidade, pode levar à morte por asfixia (Scholz & Salgado-Maldonado, 2000; Pinto & Melo, 2012a; Arguedas Cortés, 2010; Mitchell *et al.*, 2005; Salgado-Maldonado & Rubio-Godoy; 2014). Aves e mamíferos (incluindo o homem) são os hospedeiros definitivos da espécie (Chai *et al.*, 2013; Hung *et al.*, 2013), sendo que para a América do Sul, o único registro de *C. formosanus* em hospedeiros definitivos foi realizado por Pinto *et al.* (2013), que encontram *Butorides striata* (Linnaeus, 1758) naturalmente infectado no Brasil.

A identificação morfológica de *C. formosanus* obtidos em *M. tuberculata* no Peru foi confirmada pela análise molecular e revelou que a sequência parcial do gene 18S rRNA obtida apresenta 100% de similaridade com uma sequência de *C. formosanus* proveniente de Tailândia (Thaenkham *et al.*, 2010), e 99,8% com outro isolado do parasito dos EUA. Além disso, não foram verificadas diferenças genéticas com sequências obtidas a partir de adultos de *C. formosanus* obtidos no Brasil. Cabe ressaltar que Jara (1999) realizou um estudo para determinar a prevalência de formas parasitárias de trematódeos em peixes dos rios Moche e Chicama, no

departamento de Libertad (noroeste do Peru). Este autor detectou elevado número de metacercárias nas brânquias de *Xiphophorus hellerei* Heckel, 1848 e *Aequidens rivulatus* Günther, 1859, as quais foram identificadas como *Centrocestus* sp., embora tenha realizado a parte experimental, não obteve sucesso.

A cercária do tipo Parapleurolofocerca foi detectada apenas no *Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa*, sendo o primeiro relato da transmissão dessa larva por *M. tuberculata* para o Peru e o segundo para América Latina. A taxa de infecção do parasito no molusco (0,18%) é considerada baixa, mas próxima ao valor obtido por Díaz *et al.* 2008 (2,1%). Devido a observações feitas durante as coletas, evidenciou-se a presença de uma maior densidade e diversidade de aves nessa área quando comparada com a *Área de Conservación Regional Humedales de Ventanilla*, o que pode estar relacionado a ausência do parasito nesse último local. O ciclo experimental do parasito com os modelos biológicos necessários permitiu a obtenção da forma adulta do parasito, identificada morfológicamente como *H. pumilio*, devido à presença de espinhos com formato triangular no complexo ventrogenital, os quais são fusiformes no caso de *H. taichui* (Pearson, 1964)

A transmissão de *H. pumilio* por *M. tuberculata* já foi detectada em outras partes do mundo, como pode ser verificado em registros que consideraram o uso dessas larvas em estudos experimentais (Abd el-Kader Saad & Abed, 1995; Scholz *et al.*, 2000; Umadevi & Madhavi, 2006; Díaz *et al.*, 2008). No ciclo biológico do parasito é necessária a participação de peixes como segundo hospedeiro intermediário, nos quais são encontradas as metacercárias na base das aletas, em contato com a musculatura. Em relação aos hospedeiros definitivos, sabe-se que são aves e mamíferos, sendo também considerada uma espécie zoonótica (De & Lee, 2011; Hung *et al.*, 2013). Coincidentemente, o único hospedeiro definitivo relatado infectado por *H. pumilio* na América do Sul é também o ‘socozinho’, *B. striata*, que foi encontrado albergando o parasito na Venezuela (Díaz *et al.*, 2008).

A análise de sequências obtidas com o uso do marcador molecular selecionado no presente estudo, revelou 100% de similaridade entre o isolado peruano de *H. pumilio* e o de origem tailandesa (Thaenkham *et al.*, 2010) e apenas 0.6% de diferença genética em relação a amostra de Israel (Dzikowski *et al.*, 2004). Embora o gene 18S rRNA seja uma área conservada, podendo limitar a distinção de espécies de um mesmo gênero, no presente estudo, o uso deste marcador permitiu confirmar a identificação de *H. pumilio*. A análise filogenética revelou que os

isolados desta espécie formam um clado separado de outras espécies do gênero, como *H. taichui* e *H. yokogawai*.

O encontro de *C. formosanus* e *H. pumilio* no Peru é importante do ponto de vista da saúde pública. Como foi mencionado anteriormente, estes heterofídeos são espécies zoonóticas, uma vez que há a participação de peixes como segundos hospedeiros intermediários no ciclo biológico desses parasitos. Isso adquire maior relevância no Peru, já que se sabe que nesse país existe o consumo de um prato típico, conhecido como *Ceviche*, que é preparado a partir de peixe cru. Isso facilitaria a aquisição de parasitos, principalmente de *H. pumilio*, uma vez que as metacercárias desta espécie encontram-se associada à musculatura do peixe. Contudo, o potencial zoonótico de *C. formosanus* não pode ser descartado. Durante o trabalho de campo, foi observada a realização de pesca por pessoas que moram ao redor das áreas de coleta, e assim, é possível que futuros casos de heterofiose possam estar ocorrendo no território peruano, o que demanda estudos futuros.

A quarta larva de trematódeo transmitida por *M. tuberculata* encontrada corresponde ao tipo Gimnocéfala, registrada pela primeira vez no Peru. Esta cercária se assemelha a larvas previamente descritas por Vergara *et al.* (2009) na Colômbia e Pinto & Melo (2012b) no Brasil, principalmente por apresentar vesícula excretora em forma Y e pela ausência de estilete na ventosa oral. Justamente pelas características morfológicas e após revisão bibliográfica, Pinto & Melo (2012b) identificaram ao parasito como representante do gênero *Renicola*. Assim, pela semelhança de cercária do tipo Gimnocéfala encontrada no presente estudo com a encontrada no território brasileiro, se considera que pertence também ao mesmo gênero. Estudos experimentais em peixes visando a obtenção de metacercárias foram realizados, mas sem sucesso.

Na América Latina duas espécies do gênero *Renicola*, *R. cruzi* Wright, 1954 e *R. mirandaribeiroi* Freitas, 1955 foram relatadas em aves (revisado por Fernandes *et al.*, 2015). No Peru, Cocha (1949) relatou o encontro de um trematódeo nos rins de exemplares de *Phalacrocorax bougainvillei* Lesson, 1837 no litoral da cidade de Lima, presuntivamente identificado como pertencente à família Troglotrematidae. No entanto, Tantaleán *et al.* (1992), em revisão bibliográfica de trematódeos que ocorrem no Peru, revisaram a identificação desse parasito, verificando que na realidade trata-se de um representante do gênero *Renicola*. Sabe-se que espécies do gênero *Renicola* podem apresentar ciclos biológicos envolvendo moluscos marinhos ou de água doce (Bray *et al.*, 2008). Contudo, tendo em vista que *M. tuberculata* foi

introduzido na década dos 1970, se presume que a espécie encontrada por Coha (1949) corresponda a uma espécie distinta da transmitida por *M. tuberculata* na América do Sul.

Com relação à análise das sequências obtidas a partir da cercária de *Renicola* sp. coletadas em *M. tuberculata* no Peru, verificou-se 98,3% de similaridade com sequências obtidas de metacercárias removidas do fígado de *Tilapia zillii* em Israel, as quais foram consideradas como um membro da ordem Plagiorchiida (Dzikowski *et al.*, 2004). Sabe-se que metacercárias do gênero *Renicola* localizam-se no fígado de peixes (Pinto & Melo, 2012b), o que pode revelar a proximidade entre os a amostra encontrada em Israel e na América do Sul. No presente estudo, a identificação morfológica das cercárias como *Renicola* sp. é reforçada pela análise filogenética, que revelou a formação de um clado comum com outras espécies do mesmo gênero, como *Renicola* sp. da Ucrânia (Olson *et al.*, 2003) e *R. lari* registrada na República Checa (Heneberg *et al.*, 2016), mas com diferenças genéticas superiores a 2%. Novos estudos, experimentais e moleculares, necessitam serem realizados visando a identificação específica de *Renicola* sp. transmitida por *M. tuberculata* na América do Sul.

Os demais hospedeiros naturais envolvidos na transmissão das espécies de trematódeos encontradas em *M. tuberculata* no Peru necessitam ainda serem identificados. Os possíveis impactos ao meio ambiente e à saúde humana relacionados à introdução e à manutenção destes parasitos são desconhecidos ou negligenciados neste país e no continente americano como um todo. Além disso, novos estudos envolvendo a utilização de outros marcadores moleculares para a caracterização de isolados dos trematódeos encontrados poderão fornecer informações sobre possíveis rotas de introdução e dispersão destas espécies nas áreas onde foram introduzidas. O número crescente de relatos da ocorrência destes parasitos na América sinaliza que estes parasitos se encontram em expansão pelo continente. Nesse sentido, estratégias de controle ainda não avaliadas no contexto destas parasitoses nestes locais onde foram introduzidas, são urgentemente necessárias.

7 CONCLUSÃO

Melanoides tuberculata atua na transmissão de *Centrocestus formosanus*, *Haplorchis pumilio*, *Philophthalmus gralli* e *Renicola* sp. no litoral central do Peru.

8 REFERÊNCIAS

Abd el-Kader Saad AI, Abed GH. Studies on the life cycle of *Haplorchis pumilio* (Looss, 1896) with morphological redescription of larval and adult stages. J Egypt Soc Parasitol. 1995; 25(3): 795-806.

Alvarado L, Pariona R, Beltrán M. Casos de paragonimiasis (Paragonimiosis) en el Hospital Nacional Sergio E. Bernales (Lima, Perú). Rev Per Med Exp Salud Pública. 2004; 21(2): 107-110.

Arguedas-Cortés D, Dolz G, Romero-Zúñiga JJ, Jiménez-Rocha AE, León-Alán D. *Centrocestus formosanus* (Opisthorchiida: Heterophyidae) como causa de muerte de alevines de tilapia gris *Oreochromis niloticus* (Perciforme: Cichlidae) en el Pacífico seco de Costa Rica. Rev Biol Trop. 2010; 58(4): 1453-1465.

Arizmendi-Espinosa MA. Descripción de algunas etapas larvárias y de la fase adulta de *Centrocestus formosanus* de Tezontepec de Aldama, Hidalgo. An Inst Biol Univ Nac Auton Mex Ser Zool. 1992; 63(1): 1-11.

Arya LK, Rathinam SR, Lalitha P, Kim UR, Ghatani S, Tandon V. Trematode fluke *Procerovum varium* as cause of ocular inflammation in children, South India. Emerg Infect Dis. 2016; 22(2): 192-200.

Ben-Ami F, Heller J. Temporal patterns of geographic parthenogenesis in a freshwater snail. Biol J Linnean Soc. 2007; 91(4): 711-718.

Bhadury P, Austen MC, Bilton DT, Lamshead PJD, Rogers AD, Smerdon GR. Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. Mar Ecol Prog Ser. 2006; 320: 1-9.

Blair D, Barker SC. Affinities of the Gyliacnidae: utility of the 18S rDNA gene for phylogenetic inference in the digenea (Platyhelminthes). *Int J Parasitol*. 1993; 23(4): 527-532.

Blair D, Campos A, Cummings MP. Evolutionary biology of parasitic platyhelminths: the role of molecular phylogenetics. *Parasitol Today*. 1996; 12(2): 66-71.

Bolaji DA, Edokpayi CA, Samuel OB, Akinnigbagbe RO, Ajulo AA. Morphological characteristics and salinity tolerance of *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774). *World J Biol Res*. 2011; 4(2): 1-11.

Bray RA, Gibson DI, Jones A. Keys to the Trematoda. Vol. 3. London: CAB International and Natural History Museum; 2008. 824 pp.

Carazas N, Camargo L, Gil F, Zárate R. Avifauna del Área de Conservación Regional (ACR) Humedales de Ventanilla, Callao, Perú: Actualización. *Científica*; 2015a, 12(1): 9-25.

Carazas N, Gil F, Liviach R, Zárate R, Montalvo J. Nuevos registros de Fauna en el Área de Conservación Regional (ACR) Humedales de Ventanilla. *Científica*; 2015b, 12(1): 42-60.

Chai JY, Sohn WM, Yong TS, Eom KS, Min DY, Lee MY, Insisiengmay B, Phommasack B, Rim HJ. *Centrocestus formosanus* (Heterophyidae): Human infections and the infection source in Lao PDR. *J Parasitol*. 2013; 99(3): 531-536.

Chen HT. A study of the Haplorchinae (Looss, 1899) Poche 1926 (Trematoda: Heterophyidae). *Parasitology*. 1936; 28(1): 40-55.

Chen HT. The metacercaria and adult of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924), with notes on the natural infection of rats and cats with *C. armatus* (Tanabe, 1922). *J Parasitol*. 1942; 28(4): 285-298.

Chen HT. Some early larval stages of *Centrocestus formosamus* (Nishigori, 1924). Lignan Sci J. 1948; 22(1/4): 93-104.

Chen YZ, Xu XL, Chen BJ, Guo ZF, Zhen HY, Lin SS. First report on human infection on *Centrocestus formosanus* (in Fujian). Chin J Parasitol Parasit Dis. 1991; 9: 273.

Cheng TC, Thakur AS. Thermal activation and inactivation of *Philophthalmus gralli* metacercariae. J Parasitol. 1967; 53(1): 212-213.

Chinchayán V, Pulido G, Oblitas L, Peña F. Análisis y determinación de macrozoobentos en la Laguna de Marvilla de los Humedales de Villa, Chorrillos-Perú [monografía] [Internet]. 2008 [citado 2016 Jul 22]. Disponible em: <http://www.monografias.com/trabajos-pdf/macrozoobentos-laguna-marvilla-humedales-peru/macrozoobentos-laguna-marvilla-humedales-peru.pdf>

Choudhary K, Verma AK, Swaroop S, Agrawal N. A review on the molecular characterization of digenean parasites using molecular markers with special reference to ITS region. Helminthologia. 2015; 52(3): 167-187.

Chontanarth T, Wongsawad C. *Haplorchis taichui* infection of the freshwater snails and molecular identification. Trends Food Sci Tech. 2010; 2(1): 7-12.

Coha JM. Investigación preliminary al studio de tremátode en los riñones del guanay *Phalacrocorax bougainvillei*. Bol Comp Adm Guano (Lima) 1949; 25: 295-302.

Cornejo W, Huiza A, Espinoza Y, Alva P, Sevilla C, Centurion W. Paragonimosis in the Cajabamba districts, Cajamarca, Peru. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2000; 42(5): 245-247.

Criscione CD, Poulin R, Blouin MS. Molecular ecology of parasite: elucidating ecological and microevolutionary processes. Mol Ecol. 2005; 14(8): 2247-2257.

De NV, Le TH. Human infections of fish-borne trematodes in Vietnam: prevalence and molecular specific identification at and endemic commune in Nam Dinh province. *Exp Parasitol.* 2011; 129(4): 355-361.

Dailey M, Ellin R, Parás A. First report of parasites from pinnipeds in the Galapagos Islands, Ecuador, with a description of a new species of *Philophthalmus* (Digenea: Philophthalmidae). *J Parasitol.* 2005; 91(3): 614-617.

Dawes B. *The Trematoda*. London: Cambridge University Press; 1946 reprinted in 1968. 644 pp.

Díaz MT, Hernández LE, Bashirullah AK. Experimental life cycle of *Philophthalmus gralli* (Trematoda: Philophthalmidae) in Venezuela. *Rev Biol Trop.* 2002; 50(2): 629-641.

Díaz MT, Hernández LE, Bashirullah AK. Studies on the life cycle of *Haplorchis pumilio* (Looss, 1896) (Trematoda: Heterophyidae) in Venezuela. *Rev Cient (Maracaibo).* 2008; 18(1): 35-42.

Dudgeon D. The life cycle, population dynamics and productivity of *Melanooides tuberculata* (Müller, 1774) (Gastropoda: Prosonbranchia: Thiaridae) in Hong Kong. *J Zool.* 1986; 208(1): 37-53.

Dzikowski R, Levy MG, Poore MF, Flowers JR, Paperna I. Use of rDNA polymorphism for identification of Heterophyidae infecting freshwater fishes. *Dis Aquat Organ.* 2004; 59(1): 35-41.

Facon B, Pointier JP, Glaubrecht M, Poux C, Jarne P, David P. A molecular phlogeography approach to biological invasions of the New World by parthenogenetic thiarid snails. *Mol Ecol.* 2003; 12 (11): 3025-3039.

Faltýnková A, Sures B, Kostadinova A. Biodiversity of trematodes in their intermediate mollusc and fish hosts in the freshwater ecosystems of Europe. *Syst Parasitol.* 2016; 93(3): 283-293.

Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol.* 1981; 17(6): 368-376.

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

Fernandez M, Littlewood DTJ, Latorre A, Raga JA, Rollinson D. Phylogenetic relationships of the family Campulidae (Trematoda) based on 18S rRNA sequences. *Parasitology.* 1998; 117(4): 383-391.

Figueira GF, Oliveira VHSD, Taroda A, Alfieri AA, Headley SA. Molecular characterization of *Eurytrema coelomaticum* in cattle from Paraná, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2014; 23(3): 383-386.

Folmer O, Hoeh WR, Black MB, Vrijenhoek RC. Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994; 3(5): 294-299.

Frandsen F, Christensen NO. An introductory guide to identification of cercariae from African freshwater snails with special reference to cercariae of trematode species of medical and veterinary importance. *Acta Trop.* 1984; 41(2): 181-202.

Freitas JFT. Sobre dois trematódeos parasitos de aves: *Philophthalmus lachrymosus* Braun, 1902 e *Renicola mirandaribeiroi* n. sp. *Arch Mus Nac. (Rio de Janeiro).* 1955; 42: 585-610.

Giovanelli A, Silva CLPC, Leal GBE, Baptista DR. Habitat preference of freshwater snails in relation to environmental factors and the presence of the competitor snail *Melanooides tuberculatus* (Müller, 1774). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005a; 100(2): 169-176.

Giovanelli A, Vieira MV, Silva CLPC. Interaction between the intermediate host of schistosomiasis in Brazil, *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and a possible competitor, *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774): a field study. *J Mollusc Stud.* 2005b; 71(1): 7-13.

Gold D, Lengy J. Studies on larval stages of digenetic trematodes in aquatic molluscs of Israel. 4. On five cercariae from the freshwater snail *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774). *Isr J Zool.* 1974; 23(3-4): 143-161.

Guimarães CT, Souza CP, Soares DM. Possible competitive displacement of planorbids by *Melanoides tuberculata* in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96(Suppl.): 173-176.

Gutierrez Y, Grossniklaus HE, Annable WL. Human conjunctivitis caused by bird parasite *Philophthalmus*. *Am J Ophthalmol.* 1987; 104(4): 417-419.

Hasseb MA. Studies on the systematic and biology of larval trematodes infecting freshwater snails in the Punjab, Pakistan. Tese de doutorado. Lahore, Universidade de Punjab. 1980. 510f.

Heller J, Farstay V. A field method to separate males and females of the freshwater snails *Melanoides tuberculata*. *J Moll Stud.* 1989; 55(3): 427-429.

Heneberg P. Reply to the comment by HA Pinto and de Melo on “Taxonomic comments on South American species of *Philophthalmus* Looss, 1899 (Trematoda: Philophthalmidae)”. *Parasitol Int.* 2013; 62(5): 485-486.

Heneberg P, Rojas A, Bizos J, Kockivá L, Malá M, Rojas D. Focal *Philophthalmus galli* infection possibly persists in *Melanoides tuberculata* over two years following the definitive hosts' removal. *Parasitol Int.* 2014; 63(6): 802-807.

Heneberg P, Sitko J, Bizos J, Horne EC. Central European parasitic flatworms of the family Rencolidae Dollfus, 1939 (Trematoda: Plagiorchiida): molecular and comparative morphological

analysis rejects the synonymization of *Renicola pinguis* complex suggested by Odening. Parasitology. 2016; 143(12): 1592-1604.

Hernández LE, Díaz MT, Bashirullah A. Description of diferente developmental stages of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Digenea: Heterophyidae). Rev Cient (Maracaibo). 2003; 13(4): 285-292.

Horák P, Mikes L, Lichtenbergová L, Skála V, Soldánová M, Brant SV. Avian schistosomes and outbreaks of cercarial dermatitis. Clin Microbiol Rev. 2015; 28(1): 165-190.

Hung NM, Madsen H, Fried B. Global status of fish-borne zoonotic trematodiasis in humans. Acta Parasitol. 2013; 58(3): 231-258.

Huston DC, Worsham MD, Huffman DG, Ostrand KG. Infection of fishes, including threatened and endangered species by the trematode parasite *Haplorchis pumilio* (Looss, 1896) (Trematoda: Heterophyidae). Bioinvasions Rec. 2014; 3(3): 189-194.

Iannacone J, Mansilla J, Ventura K. Macroinvertebrados en las lagunas de Puerto Viejo, Lima-Perú. Ecol Apl. 2003; 2(1): 116-124.

Iannacone J, Atasi M, Bocanegra T, Camacho M, Montes A, Santos S, Zuñiga H, Alayo M. Diversity of birds in Pantanos de Villa wetland, Lima, Peru: period 2004-2007. Biota Netrop. 2010; 10(2): 295-304.

Iannacone J, La Torre, MI, Flores LA, Cepeda C, Oroya HA, Argota G. Toxicity of the biopesticides agave americana, *Furcraea andina* (Asparagaceae) and *Sapindus saponaria* (Sapindaceae) on invader snail *Melanooides tuberculata*. Neotrop Helminthol. 2013; 7(2): 231-241.

Ibáñez-Herrera N. Paragonimiasis: an important endemic disease in Peru. Sciéndo. 2012; 15(1): 89-96.

INRENA. Instituto Nacional de Recursos Naturales. Pantanos de Villa. Plan Maestro de los Pantanos de Villa. Ministerio de Agricultura. Lima-Perú. 1998. 83 pp.

Ito J. Studies of the fresh water cercariae in Leyte Island, Philippines 3. Cercariae from Thiaridae. Jpn J Exp Med. 1977; 47(4): 223-248.

Jones A, Bray R, Gibson D. Keys to the Trematoda. Vol. 2. Wallingford: CAB International and The Natural History Museum; 2005. 768 pp.

Karamian M, Aldhoun JA, Maraghi S, Hatam G, Farhangmehr B, Sadjjadi SM. Parasitological and molecular study of the furcocercariae from *Melanoides tuberculata* as a probable agent of cercarial dermatitis. Parasitol Res. 2011; 108(4): 955-962.

Keiser J, Utzinger J. Food-borne trematodiasis. Clin Microbiol Rev. 2009, 22(3): 466-483.

Kudlai O, Stunžėnas V, Tkach V. The taxonomic identify and phylogenetic relationships of *Cercaria pugnax* and *C. helvetica* XII (Digenea: Lecithodendriidae) based on morphological and molecular data. Folia Parasitol. 2015; 62: 003.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol. 2016; 33(7): 1870-1874.

Larrea CH, Florez M, Vivar M, Huamán P, Velásquez J. Hospederos intermediarios de *Fasciola hepática* en el Perú. Horiz Med. 2007; 7(1): 39-46.

Li T, He S, Zhao H, Zhao G, Zhu XQ. Major trends in human parasitic diseases in China. Trends Parasitol. 2010; 26(5): 264-270.

Literák I, Heneberg P, Sitko J, Wetzel EJ, Callirgos JMC. Eye trematode infection in small passerines in Peru caused by *Philophthalmus lucipetus*, an agent with a zoonotic potential spread by an invasive freshwater snail. *Parasitol Int.* 2013; 62(4): 390-396.

Littlewood DTJ. Platyhelminth systematics and the emergence of new characters. *Parasite.* 2008; 15(3): 333-341.

Locke SA, McMacaulin JD, Lapierre JD, Johnson PT, Marcogliese DJ. Linking larvae and adults of *Apharyngostridea cornu*, *Hysteromorpha triloba* and *Alaria mustelae* (Diplostomidae: Digenea) using molecular data. *J Parasitol.* 2011; 97(5): 846-851.

Locke SA, Caffara M, Marcogliese DJ. A large-scale molecular survey of *Clinostomum* (Digenea: Clinostomatidae). *Zool Scr.* 2015; 44(2): 203-217.

Londoño B, Chávez V, Li E, Suárez A, Pezo C. Presencia de caracoles Lymnaeidae con formas larvárias de *Fasciola hepática* em altitudes sobre los 4000 msnm en La sierra sur Del Perú. *Rev Investig Vet Perú.* 2009; 20(1): 58-65.

Lutz A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose, segundo observações feitas no Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1919; 11(1): 121-155.

Madhavi R. Distribution of metacercariae of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) on the gills of *Aplocheilus panchax*. *J Fish Biol.* 1986; 29(6): 685-690.

Madsen H, Frandsen F. The spread of freshwater snails including those of medical and veterinary importance. *Acta Trop.* 1989, 46(3): 139-146.

Malek EA, Ibañez N, Guerra A. Description of redia and cercaria of *Paragonimus peruvianus* from experimentally infected *Aroapyrgus colombiensis* of Condebamba Valley, Peru. *J Parasitol.* 1985; 71(2): 253-256.

Marcos-Raymundo LA, Maco-Flores V, Terashima A, Samalvides F, Miranda E, Tantaleán M, Espinoza JR, Gotuzzo E. Hiperendemicidad de Fasciolosis humana en el Valle del Mantaro, Perú: Factores de riesgo de la infección por *Fasciola hepática*. Rev Gastroenterol Perú. 2004; 24(2): 158-164.

Martin WE. The life histories of some Hawaiian heterophyid trematodes. J Parasitol. 1958; 44(3): 305-318.

Maurtua DT, Tantaleán M. Tipos de cercarias de trematodos en algunas zonas del Perú. Biota. 1992; 14(95): 42-57.

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

Mitchell AJ, Salmon MJ, Huffman DG, Goodwin AE, Brandt TM. Prevalence and pathogenicity of a heterophyid trematode infecting the gills of an endangered fish, the fountain darter, in two central Texas spring-fed rivers. J Aquat Anim Health. 2000; 12(4): 283-289.

Mitchell AJ, Goodwin AE, Salmon MJ, Brandt TM. Experimental infection of an exotic heterophyid trematode, *Centrocestus formosanus*, in four aquaculture fishes. N Am J Aquac. 2002; 64(1): 55-59.

Mitchell AJ, Overstreet RM, Goodwin AE, Brandt. Spread of an exotic fish-gill trematode: a far reaching and complex problem. Fisheries. 2005; 30(8): 11-16.

Moschella P. Variación y protección de humedales costeros frente a procesos de urbanización: caso Ventanilla e Puerto Viejo. Dissertação para obter o grão de mestre em *Desarrollo Ambiental*. Lima: Universidad Católica del Perú; 2012. 133 pp.

Moszczyńska A, Locke S, McLaughlin JD, Marcogliese DJ, Crease TJ. Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminthes. *Mol Ecol Resour.* 2009; 9 (Suppl. 1): 75-82.

Mukaratirwa S, Hove T, Cindzi ZM, Maononga DB, Taravinga M, Matenga E. First report of an outbreak of the oriental eye-fluke, *Philophthalmus gralli* (Mathis & Leger 1910), in commercially reared ostriches (*Struthio camelus*) in Zimbabwe. *Onderstepoort J Vet Res.* 2005; 72(3): 203-206.

Muñoz G, López Z, Cárdenas L. Morphological and molecular analyses of larval trematodes in the intertidal bivalve *Perymytilus purpuratus* from central Chile. *J Helminthol.* 2013; 87(3): 356-363.

Murray HD, Haines D. *Philophthalmus* sp. (Trematoda) in *Tarebia granifera* and *Melanoides tuberculatus* in South Texas. *Ann Rep Am Malacol Union.* 1969: 44-45.

Nasir P, Díaz MT. Avian flukes of Venezuela. *Riv Parassitol.* 1972; 33(4): 245-276.

Neal AT, Poulin R. Substratum preference of *Philophthalmus* sp. cercariae for cyst formation under natural and experimental conditions. *J Parasitol.* 2012; 98(2): 293-298.

Nishigori M. On a new species of fluke, *Stamnosoma formosanum* and its life history. *Taiwan Igakki Zasshi.* 1924; 234: 181-238.

Nolan MJ, Cribb TH. The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digeneans species. *Adv Parasitol.* 2005; 60: 101-163.

Nollen PM, Kanev I. The taxonomy and biology of philophthalmid eye flukes. *Adv Parasitol.* 1995; 36: 205-269.

Olson PD, Tkach VV. Advances and trends in the molecular systematic of the parasitic Platyhelminthes. *Adv Parasitol.* 2005; 60: 165-243.

Ortega C, Fajardo R, Enríquez R. Trematode *Centrocestus formosanus* infection and distribution in ornamental fishes in Mexico. *J Aquat Anim Health.* 2009; 21(1): 18-22.

Paredes C, Huamán P, Cardoso F, Vivar R, Vera V. Estado actual del conocimiento de los moluscos acuáticos en el Perú. *Rev Per Biol.* 1999; 6(1): 5-47.

Paula-Andrade C, Pinto HA, Coscarelli D, Vidigal THDA, Melo AL. The natural infection of *Melanoides tuberculata* (MÜLLER, 1774) (Mollusca: Gastropoda) by *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Platyhelminthes: Trematoda) in Paranoá lake, Brasília, Brazil. *Braz J Biol.* 2012; 72(2): 419-420.

Pearson JC. A revision of the subfamily Haplorchinae Looss, 1899 (Trematoda: Heterophyidae): I. The Haplorchis group. *Parasitology.* 1964; 54(4): 601-676.

Perkins SL, Martinsen ES, Falk BG. Do molecules matter more than morphology? Promises and pitfalls in parasites. *Parasitology.* 2011; 138(13): 1664-1674.

Pino J, López F, Iannacone J. Impacto ambiental en La proporción de especímenes machos em poblaciones partenogénicas de *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) (Prosobranchia: Thiaridae) en el Perú. *Biologist.* 2010; 8(2): 139-149.

Pinto RM, Santos LC, Tortelly R, Menezes RC, Moraes W. Juvenal JC, Gomes DC. Pathology and first report of natural infections of the eye trematode *Philophthalmus lachrymosus* Braun, 1902 (Digenea, Philophthalmidae) in a non-human mammalian host. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100(6): 579-583.

Pinto HA, Melo AL. *Melanooides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) as an intermediate host of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2010a; 52(4): 207-210.

Pinto HA, Melo AL. *Melanooides tuberculata* as intermediate host of *Philophthalmus gralli* in Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2010b; 52(6): 323-327.

Pinto HA, Melo AL. A checklist of trematodes (Platyhelminthes) transmitted by *Melanooides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae). Zootaxa. 2011; 2799: 15-28.

Pinto HA, Melo AL. Metacercariae of *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in *Australoheros facetus* (Pisces: Cichlidae) in Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2012a; 21(3): 334-337.

Pinto HA, Melo AL. *Melanooides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) harboring renicolid cercariae (Trematoda: Rencolidae) in Brazil. J Parasitol. 2012b; 98(4): 784-787.

Pinto HA, Melo AL. Larvas de trematódeos em moluscos do Brasil: panorama e perspectivas após um século de estudos. Rev Patol Trop. 2013a; 42(4): 369-386.

Pinto HA, Melo AL. Taxonomic comments on South American species of *Philophthalmus* Looss, 1899 (Trematoda: Philophthalmidae). Parasitol Int. 2013b; 62: 483-484.

Pinto HA, Mati VL, Melo AL. New records and a checklist of trematodes from *Butorides striata* (Aves: Ardeidae). Rev Mex de Biodivers. 2013; 84(4): 1100-1110.

Pointier JP. The introduction of *Melanooides tuberculata* (Mollusca: Thiaridae) of the Island of Saint Lucia (West Indies) and its role in the decline of *Biomphalaria glabrata*, the snail intermediate host of *Schistosoma mansoni*. Acta Trop. 1993; 54(1): 13-18.

Pointier JP. Invading freshwater snails and biological control in Martinique Island, French West Indies. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96 (Suppl.): 67-74.

Pointier JP, Giboda M. The case for biological control of snail intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*. Parasitol Today. 1999; 15(10): 395-397.

Pointier JP, Jourdane J. Biological control of the snail hosts of schistosomiasis in areas of low transmission: the example of the Caribbean area. Acta Trop. 2000; 77(1): 53-60.

Pointier JP, McCullough F. Biological control of the snail hosts of *Schistosoma mansoni* in the Caribbean area using *Thiara* spp. Acta Trop. 1989; 46(3): 147-155.

Poulin R. Morphological diversification in different trematode lineages: body size, host type, or time? Parasitology. 2009; 136(1): 85-92.

Ramírez DW, Cano A. Estado de la diversidad de la flora vascular de los Pantanos de Villa (Lima-Perú). Rev Peru Biol. 2010; 17(1): 111-114.

Ramírez R, Paredes C, Arenas J. Moluscos del Perú. Rev Biol Trop. 2003; 51(Suppl. 3): 225-284.

Rojas D, Soto C, Rojas A. Pathology and first report of natural eye infection with the trematode *Philophthalmus gralli* (Digenea, Philophthalmidae) in *Tinamus major* (Tinamiformes, Tinamidae), Costa Rica. Parasitol Int. 2013; 62(6): 571-574.

Routtu J, Grunberg D, Izhar R, Dagan Y, Guttel Y, Ucko M, Ben-Ami F. Selective and universal primers for trematode barcoding in freshwater snails. Parasitol Res. 2014; 113(7): 2535-2540.

Salgado-Maldonado G, Rodriguez-Vargas MI, Campos-Perez, JJ. Metacercariae of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Trematoda) in freshwater fishes in Mexico and their transmission by the thiatid snail *Melanoides tuberculata*. Stud Neotrop Fauna E. 1995; 30(4): 245-250.

Salgado-Maldonado G, Rubio-Godoy M. Helminths of freshwater fish introduced. *In*: Mendoza R, Koleff P. Aquatic invasive species in Mexico. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México; 2014. 269-285.

Saxena SK. A gymnocephalous cercaria, *Cercaria tandani* n. sp. from *Melanoides tuberculata* (Müller). *Helminthologia*. 1982; 19: 211-217.

Schell S. How to know the trematodes. Dubuque: W C Brown Company Publishers. 1970. 355 pp.

Scholz T, Salgado-Maldonado G. The introduction and dispersal of *Centrocestus formosanus* (Nishigori, 1924) (Digenea: Heterophyidae) in Mexico: A review. *Am Midl Nat*. 2000; 143(1): 185-200.

Scholz T, Aguirre-Macedo ML, Díaz de León ATSF, Ditrich O. Larval stages of trematodes in Mexican freshwater mollusks: a review of present state and methodology for future research. *In*: García-Aldrete AN, Salgado-Maldonado G, Vidal-Martínez VM, Metazoan parasites in the neotropic: a systematic and ecological perspective. México: Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México; 2000. 77-100.

Schuster R. *Philophthalmus aweerensis* n. sp. (Trematoda: Philophthalmidae) found in a rhea (*Rhea americana*) in the United Arab Emirates. *Parasitol Res*. 2011; 109(4): 1029-1033.

Schuster R, Aldhoun JA, O'Donovan D. *Gigantobilharzia melanoidis* n. sp. (Trematoda: Schistosomatidae) from *Melanoides tuberculata* (Gastropoda: Thiaridae) in the United Arab Emirates. *Parasitol Res*. 2014; 223(3): 959-972.

SERNANP. Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado. Plan Maestro Del Refugio de Vida Silvestre Pantanos de Villa 2016-2020. 2016 69 pp.

Silva RE, Melo AL, Pereira LH, Frederico LF. Levantamento malacológico da Bacia Hidrográfica do Lago Soledade, Ouro Branco, (Minas Gerais, Brasil). Rev Inst Med Trop. São Paulo. 1994; 36(5): 437-444.

Skov J, Kania PW, Dalsgaard A, Jørgensen TR, Buchmann K. Life cycle stages of heterophyid trematodes in Vietnamese freshwater fishes traced by molecular and morphometric methods. Vet Parasitol. 2009; 160(1): 66-75.

Sommerville C. The pathology of *Haplorchis pumilio* (Looss, 1896) infections in cultured tilapias. J Fish Dis. 1982; 5(3): 243-250.

Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol. 1993; 10(3): 512-526.

Tantaléan M, Sarmiento L, Huiza A. Digeneos (Trematoda) del Perú. Bol Lima. 1992; 14(80): 47-84.

Thaenkham U, Blair D, Waikagul J, Phuphisut O. Resolving the classification of heterophyid intestinal flukes (Heterophyidae: Trematoda) using molecular and morphological data. Informação não publicada. Sequência de nucleotídeos disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ874608.1>

Tkach VV, Kudlai O, Kostadinova A. Molecular phylogeny and systematics of the Echinostomatoidea Looss, 1899 (Platyhelminthes: Digenea). Int J Parasitol. 2016; 46(3): 171-185.

Tolley-Jordan LR, Owen JM. Habitat influences snail community structure and trematode infection levels in a spring-fed river, Texas, USA. Hydrobiologia. 2008; 600(1): 29-40.

Tolley-Jordan LR, Chadwick MA. *Centrocestus formosanus* Nishigori (Asian gill-trematode). In: Francis RA, A handbook of global freshwater invasive species. New York, Earthscan; 2012. 401-420.

Umadevi K, Madhavi R. The life cycle of *Haplorchis pumilio* (Trematoda: Heterophyidae) from the Indian region. J Helminthol. 2006; 80(4): 327-332.

Van Steenkiste N, Locke SA, Castelin M, Marcogliese DJ, Abbott CL. New primers for DNA barcoding of digeneans and cestodes (Platyhelminthes). Mol Ecol Resour. 2015; 15(4): 945-952.

Vasconcelos MC, Espírito-Santo MM, Barbosa FAR. Depth effects on the abundance, survivorship rate and size of *Melanoides tuberculatus* (Prosobranchia: Thiaridae) in Dom Helvécio Lake, Minas Gerais, Brazil. Acta Limnol Bras. 2009; 21(4): 393-397.

Velásquez LE, Bedoya JC, Areiza A, Vélez I. Primer registro de *Centrocestus formosanus* (Digenea: Heterophyidae) en Colombia. Rev Mex Biodivers. 2006, 77(1): 119-121.

Vergara D, Velásquez LE. Larval stages of digenea from *Melanoides tuberculata* (Gastropoda: Thiaridae) in Medellín, Colombia. Acta Biol Colomb. 2009, 14(1): 135-142.

Verocai GG, Lopes LN, Burlini L, Correia TR, Souza CP, Coumendouros K. Occurrence of *Philophthalmus gralli* (Trematoda: Philophthalmidae) in farmed ostriches in Brazil. Trop Anim Health Prod. 2009; 41(7): 1241-1242.

Vivar R, Larrea H, Huamán P. Um gasterópodo de La família Thiaridae en el Perú: *Melanoides tuberculata*, Müller 1774. Bol Lima. 1990; 69: 33-34.

Vogler RE, Núñez V, Gregoric DEG, Beltramino AA, Peso JG. *Melanoides tuberculata*: The history of an invader. In: HäMäläinen EM, Järvinen S. Snails: biology, ecology and conservation. New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2012. 65-84.

Wei NWV, Wallace CC, Dai CF, Pillay KRM, Chen CA. Analyses of the ribosomal internal transcribed spacers (ITS) and 5.8 S gene indicate that extremely high rDNA heterogeneity is a unique feature in the scleractinian coral genus *Acropora* (Scleractinia: Acroporidae). *Zool Stud.* 2006; 45(3): 404-418.

Weir S, Salice C. High tolerance to abiotic stressors and invasion success of the slow growing freshwater snail, *Melanoides tuberculatus*. *Biol Invasions.* 2012; 14(2): 285-394.

Yamaguti S. Synoptical review of life histories of digenetic trematodes of vertebrates with special reference to the morphology of their larval forms. Tokyo, Keigaku Pushing Co.; 1975. 590pp.

Ximenes RF, Gonçalves ICB, Miyahira IC, Pinto HA, Melo AL, Santos SB. *Centrocestus formosanus* (Trematoda: Heterophyidae) in *Melanoides tuberculata* (Gastropoda: Thiaridae) from Vila do Abraão, Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Biol.* 2016 (*in press*).

9 ANEXO

Requerimento para o ingresso dos moluscos no território brasileiro



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA
 CITES - SISTEMA DE EMISSÃO DE LICENÇAS

REQUERIMENTO Nº 130023

TIPO DE REQUERIMENTO Importação/Import	DATA
SITUAÇÃO DO REQUERIMENTO EM 05/08/2016 Material isento de licença de exportação devido à revogação da IN Ibama 154 de 2007.	
EXPORTADOR/REEXPORTADOR Eduardo Alberto Pulido Murillo ENDEREÇO: Avenida Aviación 1054, Pueblo Joven 12 de octubre CIDADE: Chimbote - CEP: 02800 PAÍS: Peru - PE	
IMPORTADOR HUDSON ALVES PINTO ENDEREÇO: UFMG AV. ANTÔNIO CARLOS CIDADE: BELO HORIZONTE - CEP: 31270901 E-MAIL: hudsonalves13@ig.com.br - FONE: 03134092978 PAÍS: Brasil - BR	
PAÍS EXPORTADOR/REEXPORTADOR Peru - PE	
PAÍS IMPORTADOR Brasil - BR	
OBJETIVO DA OPERAÇÃO Scientific/Fins científicos...	
DADOS DA SAÍDA/ENTRADA DO(S) PRODUTO(S) LOCAL: ALF/AI Confins DATA PROVÁVEL: 26/07/2016	
CONSIDERAÇÕES IBAMA Prezado, trata-se de espécie exótica, e mesmo assim, não precisa de licença de exportação por conta da revogação da IN Ibama 154/2007.	
OBSERVAÇÕES DO USUÁRIO As atividades a serem realizadas com o material biológico não são consideradas acesso ao patrimônio genético, estando de acordo com a Resolução nº21/2006 do CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO (CGEN).	

17) Item	21) Anexo/Origem Appendix/Source	18) Produto/Product	19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit
20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name		22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark	23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Date 24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Date
17) I		18) ANIMAL VIVO/ALIVE ANIMAL	19) - - 20.00 UN - -
20) 1. Melanoides tuberculatus	21) NC W	22) animal vivo/alive animal 20,00 - UN -	23) - - 24) - -
17) II		18) ANIMAL MORTO - PARTE/BODY - PIECE	19) - - 40.00 UN - -
20) 1. Melanoides tuberculatus	21) NC W	22) animal morto/body 20,00 - UN -	23) - - 24) - -
20) 2. Melanoides tuberculatus	21) NC W	22) animal vivo/alive animal 20,00 - UN -	23) - - 24) - -