

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**TESE**

**Biodiversidade de espécies de Diplostomoidea (Trematoda:  
Digenea: Diplostomida) em peixes de água doce no Brasil:  
uma abordagem integrativa**

**Naraiana Lopes Taborda**

**2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**BIODIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE DIPLOSTOMOIDEA  
(TREMATODA: DIGENEA: DIPLOSTOMIDA) EM PEIXES DE ÁGUA  
DOCE NO BRASIL: UMA ABORDAGEM INTEGRATIVA**

**Naraiana Lopes Taborda**

*Sob a Orientação do Professor*  
**José Luis Fernando Luque Alejos**

*e Coorientação de*  
**Simona Georgieva**

Tese submetida como requisito parcial para  
obtenção do grau de **Doutora em Ciências**,  
no Curso de Pós Graduação em Ciências  
Veterinárias.

Seropédica, RJ  
Agosto de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T114b Taborda, Naraiana Lopes, 1991-  
Biodiversidade de espécies de Diplostomoidea  
(Trematoda: Digenea: Diplostomida) em peixes de água  
doce no Brasil: uma abordagem integrativa / Naraiana  
Lopes Taborda. - Seropédica, 2020.  
142 f.

Orientador: José Luis Fernando Alejos.  
Coorientadora: Simona Georgieva.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, Parasitologia Animal/ Ciências, 2020.

1. Diplostomoidea. 2. associação parasito  
hospedeiro. 3. taxonomia integrativa. I. Alejos, José  
Luis Fernando , 1962-, orient. II. Georgieva, Simona  
, 1983-, coorient. III Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro. Parasitologia Animal/ Ciências. IV.  
Titulo.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 5447/2021 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.085716/2021-34

Seropédica-RJ, 30 de novembro de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**NARAIANA LOPES TABORDA**

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor(a)/Mestre(a) em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 27/08/2020

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

*(Assinado digitalmente em 30/11/2021 13:55)*

JOSE LUIS FERNANDO LUQUE ALEJOS  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
CORIN (12.28.01.49)  
Matrícula: 2242796

*(Assinado digitalmente em 30/11/2021 11:56)*

RAQUEL DE OLIVEIRA SIMOES  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)  
Matrícula: 3092534

*(Assinado digitalmente em 01/12/2021 07:32)*

MARCOS TAVARES DIAS  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 041.498.148-05

*(Assinado digitalmente em 30/11/2021 19:53)*

CLÁUDIA PORTES SANTOS SILVA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 594.361.667-53

*(Assinado digitalmente em 30/11/2021 19:57)*

LUÍS CLÁUDIO MUNIZ PEREIRA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 839.740.757-04

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 5447, ano: 2021, tipo: ATA, data de emissão: 30/11/2021 e o código de verificação: 40f433511c

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Orlando e Maria das Graças, ao meu irmão Diego e ao meu noivo Yuri que me incentivaram em cada momento e deram todo o suporte para esta conquista. Não foi fácil, mas vocês estiveram presentes tornando o caminho mais suave. Dedico especialmente (*in memoriam*) à minha avó Francisca Taborda que acreditava no poder da educação e não escondia o orgulho que sentia ao trilharmos este caminho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pelas bênçãos recebidas em todos os momentos de minha vida. Cada momento desta trajetória eu não estive sozinha.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Luis Fernando Luque Alejos por acreditar na minha capacidade de conduzir este trabalho. Obrigada pela oportunidade, ensinamentos, apoio e confiança durante todos esses anos que tornaram esse projeto possível.

À Dra. Simona Georgieva por sua dedicação no processamento do material e desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por todo o pronto ensinamento que foi essencial ao meu crescimento profissional.

Ao Dr. Tomáš Scholz, do Instituto de Parasitologia de České Budějovice, República Tcheca, pelo incentivo, ensinamentos no mundo da parasitologia e por me abrir as portas do seu laboratório. Obrigada por confiar a mim este projeto de importância para o Brasil.

Ao professor Juan Antonio Raga, do Instituto Cavanilles de Biodiversidad, Valência, Espanha, que sempre muito agradável, permitiu minha estadia em seu laboratório.

Ao Dr. Marcos Tavares Dias (Embrapa-AP), ao MSc. Marcos Sidney (PPGBIO-UNIFAP), ao Dr. Ricardo Massato Takemoto (UEM), ao Dr. Fernando Paiva (UFMS), ao Dr. Luiz Eduardo Roland Tavares (UFMS) por todo o apoio durante as inúmeras coletas que foram fundamentais para a realização deste projeto.

A todos amigos que em algum momento estiveram presentes no Laboratório de Parasitologia de Peixes da UFRRJ pela companhia diária, auxílio e toda amizade! Obrigada Aline Carvalho, Bruno Telles, Camila Pantoja, Carla Juliete, Celso Cruces, Fabiano Paschoal, Felipe Bisaggio, Fernanda Cunha, Iris Soares, Juliana Moreira, John Chero, Letícia Gabriela, Mariana Nogueira, Philippe Vieira, Vanessa Paschoal, com vocês o aprendizado foi além da parasitologia! “Todo mundo é igual brother (...)!”

À Camila Pantoja e Juliana Moreira que estiveram presentes em coletas cansativas, viagens internacionais de grande responsabilidade, aprendizados com o mundo dos estudos moleculares e além de tudo foram amigas.

Aos colegas do Instituto Cavanilles de Biodiversidade e Biología Evolutiva, que durante o período de estágio doutorado sanduíche me acolheram com muita alegria, me auxiliaram e tornaram minha estadia agradável.

Aos amigos do doutorado sanduíche, juntos nos fortalecemos e aprendemos mais do que está escrito em nossas teses. Em especial às amigas Mariana e Nájila que estiveram presentes dia a dia e trouxeram alegria, sabedoria e suporte em um momento único de nossas vidas. Vocês foram essenciais!

À Jeniffer, Darwin e Oliver que me acolheram em Valência e foram mais do que anfitriões.

A todos os professores e funcionários do PPGCV que sempre dispostos a nos auxiliar, dedicaram seus esforços.

Ao meu noivo, Yuri Vidal, por todo amor, paciência, apoio, além de dedicar seu tempo de descanso ao meu lado me auxiliando na produção de banco de dados ou simplesmente com apoio para continuar a trabalhar nesses momentos.

À minha família que me apoiou e mesmo que distante se fizeram presentes com muito amor.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



## RESUMO

TABORDA, NARAIANA LOPES. **Biodiversidade de espécies de Diplostomoidea (Trematoda: Digenea: Diplostomida) em peixes de água doce no Brasil: uma abordagem integrativa.** 2020. 140 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

O presente estudo utiliza de uma abordagem integrativa para compreensão da diversidade de diplostomóides no Brasil. Este projeto teve como objetivo estudar a biodiversidade de diplostomóides no Brasil e lançar luz sobre as complexas associações entre hospedeiros e parasitos. A falta de parâmetros e a identificação notoriamente difícil dos estágios larvais, representaram o principal desafio da realização do presente trabalho. Foram realizadas coletas de peixes de água doce em regiões de diferentes biomas de importante biodiversidade como Amazônia brasileira, Pantanal e Mata Atlântica, abrangendo 11 localidades e um total de 1.140 peixes de 27 famílias. No decorrer do estudo, aproveitamos a oportunidade de obter material de hospedeiros definitivos para répteis e aves que permitiram a elucidação parcial do ciclo de vida de um proterodiplostomídeo (*Prolecithodiplostomum constrictum* Dubois, 1936) e três novas espécies de *Posthodiplostomum* Dubois, 1936. O material coletado resultou na geração de um conjunto de sequências (associando gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade 1 e o rDNA nuclear 28S) para os diplostomóides sul-americanos que estavam praticamente ausentes e servirão de base para futuras avaliações de diversidade. As bibliotecas de referência morfológica e de sequências moleculares geradas complementaram substancialmente as existentes no grupo da América do Norte, Europa e África. Os resultados estão resumidos em dois capítulos focados em: (i) diversidade de proterodiplostomídeos do Brasil reportando oito espécies, das quais seis consideradas novas, fornecendo uma melhor resolução de Diplostomoidea com um posicionamento não basal de membros de Proterodiplostomidae, além da revalidação do tipo ‘proterodiplostomulum’ de metacercária no grupo; e (ii) patógenos de doenças dos pontos pretos em peixes, fornecendo dados para oito espécies recuperadas em peixes e aves hospedeiras, destacando a importância do uso de uma abordagem integrativa para identificação de espécies, ligando diferentes linhas de evidências coletadas de morfologia e biologia molecular dos parasitos. Portanto, os resultados são discutidos em termos de diversidade de espécies e processos de diversificação, endemismo e associações parasito-hospedeiro. O presente estudo enfatiza a necessidade de aprofundar nosso conhecimento não apenas sobre a diversidade de parasitos neotropicais, mas também em escala global.

**Palavras-chave:** Diplostomoidea, associação parasito-hospedeiro, taxonomia integrativa.

## ABSTRACT

TABORDA, NARAIANA LOPES. **Biodiversity of Diplostomoidea species (Trematoda: Digenea: Diplostomida) in freshwater fish in Brasil: an integrative approach.** 2020. 140 p. Thesis (Ph.D. in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

The present study uses an integrative approach to understanding the diversity of diplostomoids in Brazil. This project aimed to study the biodiversity of diplostomoids in Brazil and to shed light on the complex links between hosts and parasites. The lack of parameters and notoriously difficult identification of the metacercarial larval stages represented the main challenge accomplishing the present work. Sampling of freshwater fish were carried out in regions of different biomes with important Brazilian biodiversity as Brazilian Amazon, Pantanal and Atlantic Forest, including 11 localities and a total of 1,140 fish from 27 families. In the course of the study we profit from the opportunity to obtain material from reptile and bird definitive hosts which enable partial life-cycle elucidation of one proterodiplostomid (*Prolecithodiplostomum constrictum* Dubois, 1936) and three new species of *Posthodiplostomum* Dubois, 1936. The material collected resulted in the generating of sequence libraries (linking sequences for the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene and the nuclear 28S rDNA) for the South American diplostomoid which were virtually missing and will serve as a base for future diversity assessments. The generated morphological and sequence reference libraries substantially complemented the existing ones on the group from North America, Europe and Africa. Results are summarised in two chapters focused on: (i) proterodiplostomid diversity in the Brazilian freshwater reporting on eight species of which six putative new and further providing an improved resolution on the Diplostomoidea with a non-basal positioning of members of Proterodiplostomidae and re-validation of the type 'proterodiplostomulum' metacercaria on the group; and (ii) black-spot disease pathogens in fishes providing data for eight species recovered in fish and bird hosts, and highlighting the importance of the use of an integrative approach for species identification linking different lines of evidence gathered from morphology and molecular of parasites. Therefore, the results are discussed in terms of species diversity and diversification processes, endemism and host-parasite associations. The present study emphasizes the need to further our knowledge not only on the Neotropical trematode parasite diversity but this at global.

**Keywords:** Diplostomoidea, host-parasite associations, integrative taxonomy.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### Caracteres morfológicos

<b>CT</b>	comprimento total do corpo	<b>LE</b>	largura do esôfago
<b>LT</b>	largura total do corpo	<b>COT</b>	comprimento do órgão tribocítico
<b>CSA</b>	comprimento do segmento anterior	<b>LOT</b>	largura do órgão tribocítico
<b>LSA</b>	largura do segmento anterior	<b>COTG</b>	comprimento do órgão tribocítico glandular
<b>CSP</b>	comprimento do segmento posterior	<b>LOTG</b>	largura do órgão tribocítico glandular
<b>LSP</b>	largura do segmento posterior	<b>COV</b>	comprimento do ovário
<b>CVO</b>	comprimento da ventosa oral	<b>LOV</b>	largura do ovário
<b>LVO</b>	largura da ventosa oral	<b>CTA</b>	comprimento do testículo anterior
<b>CPF</b>	comprimento da pré-faringe	<b>LTA</b>	largura do testículo anterior
<b>CF</b>	comprimento da faringe	<b>CTP</b>	comprimento do testículo posterior
<b>LF</b>	largura da faringe	<b>LTP</b>	largura do testículo posterior
<b>CVV</b>	comprimento da ventosa ventral	<b>CBC</b>	comprimento da bolsa copulatória
<b>LVV</b>	largura da ventosa ventral	<b>LBC</b>	largura da bolsa copulatória
<b>CE</b>	comprimento do esôfago		

Distâncias medidas em espécimes em estágio de metacercária:

<b>DVVAC</b>	distância entre ventosa ventral à extremidade anterior do corpo
<b>DVVPSA</b>	distância entre ventosa ventral à margem posterior do segmento anterior
<b>DVVP</b>	distância entre ventosa ventral e a margem posterior
<b>DOTVV</b>	distância entre o órgão tribocítico à ventosa ventral

Caracteres adicionais para espécimes adultos:

<b>CC</b>	comprimento do corpo
<b>LC</b>	largura do corpo
<b>AS</b>	comprimento do segmento anterior
<b>SP</b>	comprimento do segmento posterior
<b>POST</b>	comprimento da região pós-testicular
<b>CO</b>	comprimento do ovo
<b>LO</b>	largura do ovo
<b>DVV-OT</b>	distância entre a ventosa ventral e o órgão tribocítico
<b>DOV-TA</b>	distância entre o ovário e o testículo anterior
<b>CC</b>	comprimento do cisto
<b>LC</b>	largura do cisto
<b>AntOT</b>	região anterior ao órgão tribocítico
<b>VIT</b>	vitelária

### Marcadores (gene) e análises moleculares

<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>rDNA</b>	DNA ribossomal
<b>cox1</b>	citocromo c oxidase, subunidade 1 do DNA mitocondrial
<b>28S</b>	subunidade maior do DNA ribossomal
<b>pb</b>	pares de base
<b>BI</b>	Inferência Bayesiana

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** A. Mapa do Brasil mostrando as localidades das coletas. Mapas detalhados das localidades de amostragem: B. Rio Guandu (branco). C. Rio Mogi-Guaçu (azul). D. Rio Paraná (verde). E. Rio Miranda (amarelo). F. Rio Negro (cinza). G. Rio Jamarí (rosa, 1), rio Quatro Cachoeiras (rosa, 2). H. Rio Araguari (vermelho). I. Rio Marapanim (laranja, 1), rio Maracanã (laranja, 2). Os estados do Brasil são abreviados da seguinte forma: AC, Acre; AL, Alagoas; AM, Amazonas; AP, Amapá; BA, Bahia; CE, Ceará; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MA, Maranhão; MT, Mato Grosso; MS, Mato Grosso do Sul; MG, Minas Gerais; PA, Pará; PB, Paraíba; PE, Pernambuco; PI, Piauí; PR, Paraná; RO, Rondônia; RR, Roraima; RJ, Rio de Janeiro; RN, Rio Grande do Norte; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; SE, Sergipe; SP, São Paulo; TO, Tocantins ..... 6

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Árvore filogenética com base no critério de Inferência Bayesiana (IB) reconstruído a partir das sequências 28S rDNA de membros Diplostomoidea. Os valores das probabilidades posteriores ( $\geq 0,95$ ) são indicados nos nós. A identificação das sequências foi feita de acordo com o GenBank As figuras a esquerda demonstram os tipos morfológicos das metacercárias. Legenda com figuras correspondentes aos hospedeiros abaixo ..... 31

**Figura 2.** Árvores filogenéticas com base no critério de Inferência Bayesiana (IB) para espécies da família Proterodiplostomidae. **A.** Análise filogenética do gene 28S rDNA. **B** Análise filogenética do gene *cox1* mtDNA. Os valores das probabilidades posteriores ( $\geq 0,95$ ) são indicados nos nós. Siglas: B, brânquias; C, cavidade corporal; CE, cérebro; E, estômago; L, lentes dos olhos; I, intestino; V, vesícula biliar ..... 33

**Figura 3.** Adulto de *Proterodiplostomum longum* (Brandes, 1888) coletado em *Caiman latirostris* no rio Guandu, Rio de Janeiro. Paragenóforo. Vista ventral ..... 39

**Figura 4.** Metacercária de *Proterodiplostomum* sp. 1 coletado na cavidade corporal de *Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus) no rio Paraná. Paragenóforo. Vista Ventral..... 43

**Figura 5.** Metacercária de *Proterodiplostomum* sp. 2 coletado na lente dos olhos de *Pimelodus fur* (Lütken) no rio Miranda, Mato Grosso do Sul. Hologenóforo. Vista Ventral..... 48

**Figura 6.** Metacercária de *Proterodiplostomum* sp. 3 coletado na cavidade cranial de *Hemiodontichthys acipenserinus* (Kner) no rio Jari, Amapá. Hologenóforo. Vista Ventral.... 50

**Figura 7.** Metacercária de Proterodiplostomidae gen. sp. 1 coletado no intestino de *Cichla monoculus* Agassiz no rio Jari, Amapá. Hologenóforo. Vista Ventral..... 52

**Figura 8.** Metacercária de Proterodiplostomidae gen. sp. 2 coletado na cavidade cranial de *Cichla monoculus* Agassiz no rio Jari, Amapá. Hologenóforo. Vista Ventral ..... 54

**Figura 9.** Metacercária de Proterodiplostomidae gen. sp. 3 coletado na cavidade corporal de *Hemiodontichthys acipenserinus* (Kner) no rio Jari, Amapá. Hologenóforo. Vista Ventral.... 57

**Figura 10.** *Prolecithodiplostomum constrictum*. Hologenóforo. **A.** Metacercária coletada nas brânquias de *Cyphocharax leucostictus* (Eigenmann & Eigenmann). **B.** Adulto coletado no intestino de *Paleosuchus trigonatus* (Schneider). Vista ventral..... 60

**Figura S1.** Fotomicrografias de proterodiplostomídeos; **A.** Adulto de *Proterodiplostomum longum* coletado no intestino de *Caiman latirostris* no rio Guandu, Rio de Janeiro. Metacercária de *Proterodiplostomum* spp.; **B-C.** *Proterodiplostomum* sp. 1 provindo de vesícula biliar de *Trachydoras paraguayenses* do rio Paraná, Paraná; **D.** *Proterodiplostomum* sp. 1 coletado na cavidade do corpo de *Trachelyopterus galeatus* no rio Paraná, Paraná; **E.** *Proterodiplostomum*

sp. 2 da lente do olho de <i>Pimelodus fur</i> do rio Miranda, Mato Grosso do Sul. Barras de escala: <b>A.</b> 58 mm; <b>B-E.</b> 200 µm .....	68
<b>Figura S2.</b> Fotomicrografias de Proterodiplostomídeos; <b>A.</b> <i>Proterodiplostomum</i> sp. 3 coletado no estômago de <i>Phalacrocorax brasilianus</i> no rio Jari, Amapá; <b>B.</b> <i>Proterodiplostomum</i> sp. 3 na cavidade cranial de <i>Hemiodontichthys acipenserinus</i> no rio Jari, Amapá; <b>C.</b> <i>Proterodiplostomum</i> sp. 3 no intestino de <i>Hemiodus unimaculatus</i> do rio Jari, Amapá; <b>D.</b> Proterodiplostomidae gen. sp. 1 no intestino de <i>Cichla monoculus</i> do rio Jari, Amapá; <b>E.</b> Metacercária de Proterodiplostomidae gen. sp. 2 na cavidade cranial em <i>Cichla monoculus</i> do rio Jari, Amapá, vista dorsal; <b>F.</b> Metacercária de Proterodiplostomidae gen. sp. 3 na cavidade corporal de <i>Hemiodontichthys acipenserinus</i> no rio Jari, Amapá; <b>G.</b> Metacercária de <i>Prolecithodiplostomum</i> sp. nas brânquias de <i>Cyphocarax leucostictus</i> no rio Jari, Amapá; <b>H.</b> Adulto de <i>Prolecithodiplostomum</i> sp. no intestino de <i>Paleosuchus trigonatus</i> no rio Jari, Amapá. Barra de escala: <b>A-D.</b> 100 µm; <b>E-H.</b> 200 µm .....	69

## CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> Análise filogenética do gene 28S rDNA para membros da subfamília Crassiphialinae. Clados identificados de acordo com Achatz et al. (2019). Os suportes nodais são dados acima dos ramos, as probabilidades de valores inferiores a 0.90 foram suprimidos .....	87
<b>Figura 2.</b> Análise filogenética do gene <i>cox1</i> mtDNA com sequências amplificadas com os iniciadores MplatCOX1dF + MplatCOX1dR e Plat-diploCOX1F + Plat-diploCOX1R para membros da subfamília Crassiphialinae. Clados identificados de acordo com Achatz et al. (2019). Os suportes nodais são dados acima dos ramos, as probabilidades de valores inferiores a 0.90 foram suprimidos. Siglas: B, brânquias; BN, bexiga natatória; CE, cérebro; ES, esclera; HV, humor vítreo; I, intestino .....	88
<b>Figura 3.</b> Análise filogenética do gene <i>cox1</i> mtDNA com sequências amplificadas com os iniciadores JB3 + JB4.5/CO1-R trema para membros da subfamília Crassiphialinae. Clados identificados de acordo com Achatz et al. (2019). Os suportes nodais são dados acima dos ramos, as probabilidades de valores inferiores a 0.90 foram suprimidos. Siglas: B, brânquias; BN, bexiga natatória; CE, cérebro; ES, esclera; E, estômago; HV, humor vítreo; I, intestino; ND, nadadeira; R, retina .....	89
<b>Figura 4.</b> Fotomicrografia de espécimes de <i>Posthodiplostomum</i> sp. 10. <b>A.</b> Espécime adulto coletado em <i>Ardea cocoi</i> Linnaeus, vista ventral; <b>B.</b> Espécime em estágio de metacercária coletado em <i>Cichla monoculus</i> Agassiz. Barra de escala: A-200 µm, B-500 µm.....	92
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografia de metacercária de <i>Posthodiplostomum</i> sp. 11 coletado em <i>Phalacrocorax brasilianus</i> (Gmelin), vista ventral. Barra de escala: 200 µm.....	98
<b>Figura 6.</b> Fotomicrografia de <i>Posthodiplostomum</i> sp. 12. <b>A.</b> Espécime adulto coletado em <i>Ardea cocoi</i> Linnaeus, vista ventral. <b>B.</b> Espécime em estágio de metacercária coletado no humor vítreo de <i>Mesonauta acora</i> (Castelnau). Barra de escala: A-100 µm; B-200 µm.....	100
<b>Figura 7.</b> Fotomicrografia de metacercária de <i>Posthodiplostomum</i> sp. 13 coletado em <i>Australoheros</i> sp., vista ventral. Barra de escala: 1 mm.....	102
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografia de metacercária de <i>Posthodiplostomum</i> sp. 14 coletado em <i>Crenicichla</i> sp., vista ventral. Barra de escala: 250 µm.....	104
<b>Figura 9.</b> Fotomicrografia de espécimes de <i>Posthodiplostomum</i> sp. 15. <b>A.</b> Espécime adulto coletado em <i>Ardea cocoi</i> Linnaeus, vista ventral; <b>B.</b> Espécime em estágio de metacercária coletado em <i>Satanoperca jurupari</i> (Heckel). Barra de escala: A-B: 200 µm .....	106
<b>Figura 10.</b> Fotomicrografia de metacercária de <i>Uvulifer</i> sp. 2 coletado em <i>Cichla monoculus</i> Agassiz, vista ventral. Barra de escala: 100 µm.....	108

**Figura 11.** Fotomicrografia de espécimes de *Uvulifer* sp. 5 coletados em *Phalacrocorax brasilianus*, **A.** Espécime adulto coletado livre no hospedeiro, vista ventral; **B.** Espécime em estágio de metacercária encistado. Barra de escala: A-200  $\mu\text{m}$ , B-100  $\mu\text{m}$  ..... 112

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Coordenadas dos pontos de coleta.....	5
<b>Tabela 2.</b> Iniciadores usados para amplificação do DNA (PCR) e sequenciamento.....	7

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.</b> Dados para espécies incluídas nas análises.....	18
<b>Tabela 2.</b> Lista de espécie de proterodiplostomídeos reportados na América do Sul .....	21
<b>Tabela 3.</b> Divergência genética média (distância p não corrigida em%) estimada para sequências <i>cox1</i> parciais intraespecíficas (diagonal, negrito) e interespecíficas para Proterodiplostomidae (abaixo da diagonal). As diferenças totais em pares de base entre as sequências 28S rDNA são fornecidas acima da diagonal.....	34
<b>Tabela 4.</b> Dados morfométricos comparativos para <i>Proterodiplostomum longum</i> (estágio adulto) .....	40
<b>Tabela 5.</b> Dados morfométricos comparativos para metacercárias de proterodiplostomídeos .....	44
<b>Tabela 6.</b> Dados morfométricos comparativos para adultos de <i>Prolecithodiplostomum</i> spp..	61

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b> Dados referentes às espécies incluídas nas análises moleculares .....	77
<b>Tabela 2.</b> Divergência genética média (distância p não corrigida em%) estimada para sequências <i>cox1</i> parciais intraespecíficas (diagonal, negrito) e interespecíficas para Proterodiplostomidae (abaixo da diagonal). As diferenças totais em pares de base entre as sequências 28S rDNA são fornecidas acima da diagonal.....	86
<b>Tabela 3.</b> Dados morfométricos comparativos entre adultos do gênero <i>Posthodiplostomum</i> relatados no Brasil. ....	93
<b>Tabela 4.</b> Dados morfométricos comparativos entre metacercárias do gênero <i>Posthodiplostomum</i> relatados no Brasil.....	95
<b>Tabela 5.</b> Dados morfométricos comparativos entre metacercárias do gênero <i>Uvulifer</i> .....	109
<b>Tabela 6.</b> Lista de espécies do gênero <i>Posthodiplostomum</i> reportados na América do Sul..	114
<b>Tabela 7.</b> Lista de espécies do gênero <i>Uvulifer</i> reportados na região Neotropical.....	117

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS</b> .....	5
2.1 Coleta .....	5
2.2 Dados Morfológicos.....	6
2.3 Sequências Geradas.....	7
<b>3. CAPÍTULO I. DIVERSIDADE DE ESPÉCIES E ESTRATÉGIAS DE CICLO DE VIDA DE TREMATÓDEOS PROTERODIPLOSTOMÍDEOS (DIGENEA: PROTERODIPLOSTOMIDAE) EM ÁGUA DOCE NEOTROPICAL</b> .....	19
<b>3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
3.2.1 Dados Morfológicos.....	16
3.2.2 Dados moleculares e análises filogenéticas .....	16
<b>3.3 RESULTADOS</b> .....	20
3.3.1 Dados moleculares .....	20
3.3.2 Relações entre Diplostomoidea.....	30
3.3.3 Considerações sobre morfotipos de metacercárias .....	36
3.3.4 Descrição das espécies e sumário taxonômico.....	36
<b>3.4 DISCUSSÃO</b> .....	65
<b>4. CAPÍTULO II. CRASSIPHIALINAE SUDARIKOV, 1960 (DIGENEA: DIPLOSTOMIDAE): NOVAS ESPÉCIES, FILOGENIA E DOENÇA DOS PONTOS PRETOS</b> .....	73
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	76
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	79
4.2.1 Análises Filogenéticas.....	79
<b>4.3 RESULTADOS</b> .....	87
4.3.1 Dados moleculares .....	87
4.3.2 Relações entre membros Crassiphialinae.....	88
4.3.3 Descrição das espécies e sumário taxonômico .....	93
<b>4.4 DISCUSSÃO</b> .....	116
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	128
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	129



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os representantes do filo Platyhelminthes Gegenbauer, 1859 são considerados entre os parasitos metazoários de maior sucesso segundo Overstreet et al. (2009), levando em consideração a distribuição geográfica, diversidade de habitats e hospedeiros, além da abundância. Como regra geral, a transmissão de membros da classe Trematoda Rudolphi, 1808 para o hospedeiro definitivo é dependente em grande parte de uma interação predador-presa (HECHINGER et al., 2008; AMUNDSEN et al., 2009). Como tal, estima-se que aproximadamente 75% das interações na cadeia alimentar possuam parasitos envolvidos (DOBSON et al., 2008). Dentre os membros do filo, a subclasse Digenea está entre os mais diversos e difundidos parasitos no ambiente aquático (CROTTI, 2013; ADLARD et al., 2015) e segundo Cribb et al. (2001) representa provavelmente o maior grupo entre os metazoários endoparasitos. Eles são caracterizados por um ciclo de vida complexo (POULIN & CRIBB, 2002 e referências nele incluídas) envolvendo vários hospedeiros e frequentemente possuem um estágio de vida livre ao qual buscam ativamente e penetram seu hospedeiro.

Segundo Littlewood et al. (2015) a ordem Diplostomida Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003 é composta por 12,7% do total das famílias de digenéticos, sendo considerada a menor em número de espécies dentro da subclasse Digenea Carus, 1863. Composta por três superfamílias, isto é, Brachylaimoidea Joyeux & Foley, 1930; Diplostomoidea Poirier 1886 e Schistosomatoidea Stiles & Hassall, 1898, na qual a maior diversidade está concentrada na superfamília Diplostomoidea (LITTLEWOOD et al., 2015).

A diversidade da superfamília Diplostomoidea está alocada em 5 famílias e a última contabilização estimou 797 espécies (LITTLEWOOD et al., 2015). Os membros desta superfamília podem ser distinguidos de todos outros trematódeos por possuir órgão tribocítico, estrutura bilobada ou similar a uma ventosa localizada posterior à ventosa ventral com função adesiva-digestiva. A morfologia desta estrutura é amplamente utilizada na distinção das espécies até mesmo das famílias (NIEWIADOMSKA, 2002a). Outra peculiaridade do grupo muitas vezes utilizada como um dos parâmetros para classificação, mesmo que em menor grau, se refere ao hospedeiro definitivo (aves, mamíferos e répteis). As subfamílias, geralmente, são específicas a determinadas classes de hospedeiro definitivo, sendo os membros da família Cyathocotylidae Mühling, 1898 os mais abrangentes (NIEWIADOMSKA, 2002a; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017).

Alguns dos representantes da superfamília são conhecidos por parasitar moluscos levando-os a morte e afetar o desenvolvimento dos peixes, tanto pela penetração das cercárias em alevinos e adultos quanto pela ação da metacercária (OVERSTREET & CURRAN, 2004). Responsáveis por perdas econômicas devido a mortalidade direta de peixes em ambientes de criação e ao aumento da susceptibilidade de predação dos indivíduos infectados (OVERSTREET & CURRAN, 2004; BULLARD & OVERSTREET, 2008), podem causar hemorragias devido a penetração do parasito, lesões com complicações bacterianas, cegueira, hiperplasia, lesões cerebrais, obstrução de vasos sanguíneos, redução da reserva de gordura, má formação, alteração do comportamento entre outros.

Apesar da existência de muitos estudos abordando Diplostomoidea somente alguns membros das famílias Diplostomidae, Strigeidae Railliet, 1919 e Cyathocotylidae possuem o ciclo de vida completamente conhecido (BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017). A taxonomia clássica se baseia na morfologia do adulto, fator que dificulta a associação dos estágios larvais uma vez que possuem pouca semelhança com os adultos (LOCKE et al., 2011). Mesmo que os estágios larvais de muitas espécies sejam de importância veterinária e médica, a literatura demonstra uma grande lacuna com muitas espécies descritas baseadas somente no estágio adulto e sem nenhuma informação de qualquer estágio larval (LOCKE et al., 2011; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017).

A identificação das metacercárias são consideradas deficientes e a falta da acurácia tem consequências práticas, uma vez que não só impede o conhecimento real da biodiversidade parasitária, mas também acaba por impossibilitar análises sobre patogenicidade, duração e rota da infecção, especificidade ao hospedeiro, distribuição geográfica, além do efeito no hospedeiros em ambientes naturais e cultivos (LOCKE et al., 2010a; BRABEC et al., 2015; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017). Felizmente é perceptível o número crescente de estudos moleculares referentes aos estágios larvais nos últimos anos, impulsionados por sua importância e a dificuldade de identificação associada ao encontro frequente (BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017). Devemos ressaltar que descrições e identificações de metacercárias a nível de espécie somente com dados morfológicos geram confusões na literatura e são rejeitadas por diversos pesquisadores (LOCKE et al., 2010a; HORÁK et al., 2019).

Morfologias similares são identificadas em metacercárias de gêneros relacionados e por essa razão atualmente podem ser classificadas em quatro tipos morfológicos: ‘diplostomulum’, ‘neascus’, ‘prohemistomulum’ e ‘tetracotyle’ (NIEWIADOMSKA, 2002a). Shoop (1989) e Niewiadomska (2002a) consideram que estes tipos morfológicos das metacercárias parecem

refletir relações dentro de Diplostomoidea, embora muitos autores não levem isto em consideração (LOCKE et al., 2018). As metacercárias possuem plasticidade fenotípica, isto é, variação em sua morfologia de acordo com a idade do parasito e espécie hospedeira (GALAZZO et al., 2002) o que torna questionável as espécies descritas somente com base em caracteres morfológicos, gerando a necessidade de reavaliação destas espécies. Levando isto em consideração, a classificação dos tipos morfológicos de metacercárias demonstra ser relevante, por exemplo, muitas espécies hoje descritas são aglomeradas nos tipos morfológicos para que futuramente com a adição de dados possam ser alocadas nos seus respectivos gêneros, como *Neascus hanumanthai*, *Neascus gussevi* e *Neascus xenentodoni*, por exemplo (CHOUDHARY et al., 2017).

A literatura demonstra esforços até a atualidade com o objetivo de organizar e compreender as interrelações dos digenéticos. Para tal, a incorporação de dados moleculares em análises morfológicas e ecológicas tem tornado o conhecimento sobre os parasitos mais robusto, permitindo o avanço de nossa compreensão da diversidade, sistemática, evolução e ciclo biológico (BRABEC et al., 2015; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017). É por meio da taxonomia integrativa que pesquisadores têm obtido resultados promissores referentes a delimitação de espécies, descoberta de espécies crípticas, reavaliação dos critérios morfológicos de identificação existentes, além da associação entre diferentes estágios de forma mais eficiente que abordagens experimentais nas quais muitas vezes fornecem apenas uma fase do ciclo de vida do parasito (LOCKE et al., 2010a; GEORGIEVA et al., 2013; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017; LOCKE et al., 2018).

Olson et al. (2003) forneceram uma sistemática relativamente estável ao grupo e embora haja contestação do status de diferentes grupos, como Diplostomida, o consenso é da necessidade de dados adicionais para diferentes linhagens de modo que se possa testar hipóteses de forma mais robusta (BRABEC et al., 2015; LOCKE et al., 2018). No Brasil existem poucos estudos utilizando da taxonomia integrativa para compreensão da diversidade de diplostomídeos. O estudo realizado por López-Hernández et al. (2018) incorpora dados morfológicos, moleculares e experimentais para *Posthodiplostomum nanum* Dubois, 1937. Pelegrini et al. (2019) caracterizaram duas espécies de diplostomídeos no estágio de metacercária, López-Hernández et al. (2019) abordaram uma infecção experimental de cercárias de cinco espécies pertencentes à superfamília Diplostomoidea para obtenção de metacercárias, incorporando dados morfológicos e moleculares. Além de Queiroz et al. (2019) que relataram *Heterodiplostomum lanceolatum* Dubois, 1936 em estágio de metacercária em

sapos, *Leptodactylus podicipinus* (Cope, 1862) do Brasil. Podemos perceber que são trabalhos extremamente recentes e se referem a estágios larvais. Pelegrini et al. (2019) ressaltaram que além de serem os primeiros estudos com análises integrativas para diplostomóides na América do Sul, a ausência de dados referentes aos adultos impede uma descrição morfológica adequada. Neste contexto, o presente estudo é o primeiro a associar os estágios metacercária e adulto do grupo por meio de métodos de taxonomia integrativa na América do Sul.

No presente estudo visamos a superfamília Diplostomoidea Poirier, 1886 que embora possua visibilidade de centros de pesquisas internacionais, as informações referentes à América do Sul ainda possuem grandes limitações, mesmo tendo condições favoráveis ao desenvolvimento destes parasitos e diversos relatos como em Dubois (1936a,b, 1968); Travassos et al. (1969) e Fernandes et al. (2015), por exemplo.

O presente trabalho teve como objetivo principal o estudo da diversidade de metacercárias da ordem Diplostomida no Brasil, por meio de uma análise taxonômica integrativa reunindo dados morfológicos e moleculares dos organismos encontrados, incorporando espécimes adultos quando possível. Podemos destacar ainda três objetivos secundários resultantes: (i) descrever o que não for conhecido pela ciência; (ii) fornecer novos dados quanto à espécies conhecidas; (iii) integrar dados de diferentes estágios quando possível. Mediante as análises nos deparamos com indivíduos de diferentes gêneros e famílias, devido a este resultado cada capítulo abrangerá um grupo diferente de parasito, porém da mesma ordem.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS

Foi utilizada a mesma metodologia em ambos os capítulos aqui apresentados, como forma de impedir informações repetidas no desenvolvimento da tese, apresentamos de forma única os processos realizados neste tópico e apenas as pequenas especificações para cada grupo serão abordadas nos capítulos.

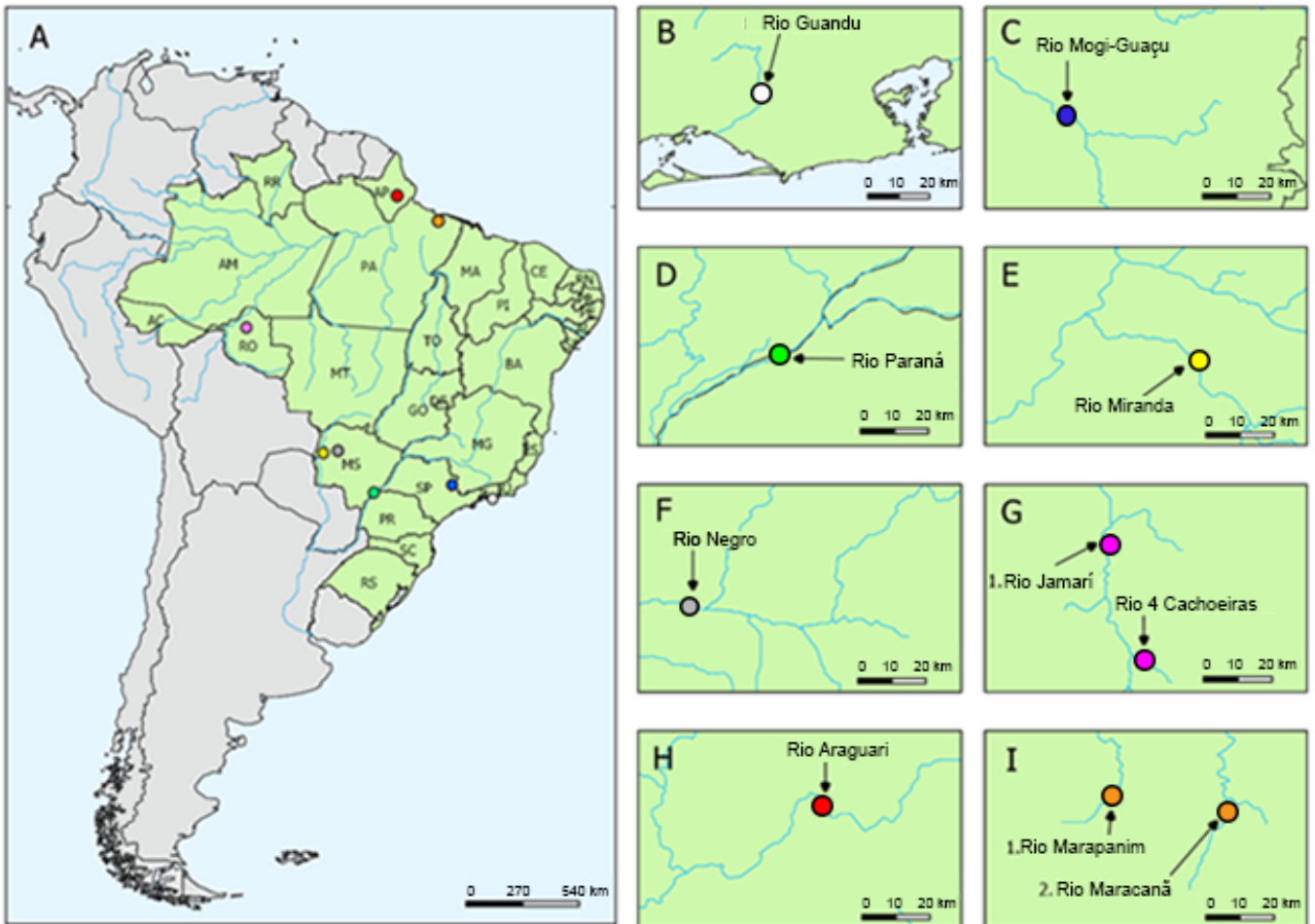
### 2.1 Coleta

Um total de 1.140 peixes compreendendo a 27 famílias foram coletados de 11 distintas localidades (ver Tabela 1, Figura 1). Os peixes foram capturados por pescadores locais por meio de redes e anzóis. As aves e jacarés foram obtidos por meio de caçadores sob licença do Sisbio e outros junto ao Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), a qual possuímos um projeto para recolhimento de animais de espécies que cheguem a óbito no local. No laboratório local os hospedeiros foram medidos (comprimento total (CT) e padrão (CP)) e imediatamente examinados para infecção parasitária seguindo o protocolo padrão. Os espécimes coletados foram lavados em solução salina, alguns foram fixados com água quente e posteriormente armazenados em álcool absoluto e outros diretamente no álcool. Parte dos espécimes coletados foram fixados em formalina quente para adicional análise morfológica.

**Tabela 1** Coordenadas dos pontos de coleta de hospedeiros

<b>Recurso hídrico</b>	<b>Cidade/Estado</b>	<b>Coordenadas</b>
Rio Araguari	Ferreira Gomes, Amapá	00°52'N 51°12'W
Rio Jari	Vitória do Jari, Amapá	1°07'S, 51°59'W
Rio Maracanã	Livramento, Pará	1°00'S, 47°24'W
Rio Marapanim	Arsênio, Pará	0°59'S, 47°39'W
Rio Miranda	Aquidauana, Mato Grosso do Sul	19°34'S, 57°0'W
Rio Negro	Aquidauana, Mato Grosso do Sul	19°34'S, 56°09'W
Rio Jamarí	Ariquemes, Rondônia	9°33'S, 63°07'W
Rio Quatro Cachoeiras	Ariquemes, Rondônia	10°01'S, 63°0.3'W
Rio Mogi-Guaçu	Ariquemes, São Paulo	21°55'S, 47°22'W
Rio Guandu	Seropédica, Rio de Janeiro	22°81'S, 43°62'W
Rio Paraná	Porto Rico, Paraná	22°45'S, 53°15'W

Para maior compreensão da distribuição dos pontos de coleta preparamos um mapa (Figura 1) utilizando o programa QGIS v.3.4.2. (<https://www.qgis.org/en/site/>) Copyright original 2018. Cada localidade é representada por um círculo com código de cores.



**Figura 1** A. Mapa do Brasil mostrando as localidades das coletas. Mapas detalhados das localidades de amostragem: B. Rio Guandu (branco). C. Rio Mogi-Guaçu (azul). D. Rio Paraná (verde). E. Rio Miranda (amarelo). F. Rio Negro (cinza). G. Rio Jamarí (rosa, 1), rio Quatro Cachoeiras (rosa, 2). H. Rio Araguari (vermelho). I. Rio Marapanim (laranja, 1), rio Maracanã (laranja, 2). Os estados do Brasil são abreviados da seguinte forma: AC, Acre; AL, Alagoas; AM, Amazonas; AP, Amapá; BA, Bahia; CE, Ceará; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MA, Maranhão; MT, Mato Grosso; MS, Mato Grosso do Sul; MG, Minas Gerais; PA, Pará; PB, Paraíba; PE, Pernambuco; PI, Piauí; PR, Paraná; RO, Rondônia; RR, Roraima; RJ, Rio de Janeiro; RN, Rio Grande do Norte; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; SE, Sergipe; SP, São Paulo; TO, Tocantins.

## 2.2 Dados Morfológicos

Foram feitas uma série de fotomicrografias com a câmera digital de um microscópio Olympus BX51 para cada espécime antes da extração do DNA. As respectivas medidas foram tiradas destas imagens digitais usando o software Fiji (ImageJ) v.1.51n (ABRAMOFF et al.,

2004) e expressas em micrômetros nas tabelas e textos. As abreviaturas usadas para os caracteres medidos são fornecidos na lista de tabelas.

### 2.3 Sequências Geradas

DNA genômico total dos espécimes fixados em álcool absoluto foram extraídos de usando Chelex® (Bio-Rad, Hercules, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. Ver Tabela 2 para detalhes referentes aos iniciadores utilizados. Devemos ressaltar que três conjuntos de iniciadores foram utilizados em todas amostras, visando a amplificação de fragmentos mitocondriais parciais de citocromo *c* oxidase subunidade 1 (*cox1*) do DNA mitocondrial. Isto devido à alta variabilidade e dificuldades na amplificação da região barcode para uma ampla gama de digenéticos e para estar em conformidade com os dados de sequências atualmente disponíveis. Como esperado não obtivemos sucesso na amplificação com alguns destes iniciadores para determinadas espécies como veremos no decorrer deste estudo. As combinações de iniciadores utilizadas foram: (i) MplatCOX1dF + MplatCOX1dR (iniciadores degenerados de Moszczyńska et al., 2009); (ii) Plat-diploCOX1F + Plat-diploCOX1R (iniciadores específicos para diplostomídeos; Moszczyńska et al., 2009); (iii) JB3 + JB4.5 (BOWLES et al., 1995) ou CO1-R trema (MIURA et al., 2005). Os iniciadores degenerados amplificaram a região barcode de Folmer inteira do gene *cox1*, enquanto o segundo conjunto de iniciadores amplificaram a região de *cox1* posteriores a região de Folmer.

**Tabela 2** Iniciadores usados para amplificação do DNA (PCR) e sequenciamento.

Gene	Nome	Dire- ção	Sequência (5' para 3')	Temperatura de Anelamento	Uso	Referência	
<i>cox1</i>	Plat-diploCOX1F	F	CGTTTRAATTATACGGATCC	50 °C	PCR + Seq	Moszczyńska et al. (2009)	
	Plat-diploCOX1R	R	AGCATAGTAATMGCAGCAGC		PCR + Seq		
	MplatCOX1dF	F	TGTAACACGACGGCCAGTTTWCITT RGATCATAAG		PCR + Seq		
	MplatCOX1dR	R	CAGGAAACAGCTATGACTGAAAYA AYAIIGGATCICCACC		PCR + Seq		
	JB3	F	TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT		PCR + Seq		Bowles et al. (1995)
	JB4.5	R	TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG		PCR + Seq		
	CO1-R trema	R	CAACAAAATCATGATGCAAAAAGG		PCR + Seq		
28S rDNA	Dig12	F	AAGCATATCACTAAGCGG	55 °C	PCR + Seq	Tkach et al. (2003)	
	1500R	R	GCTATCCTGAGGGAAACTTCG		PCR + Seq	Tkach et al. (2003)	
	900F	F	CCGTCTTGAACACGGACCAAG		Seq	Olson et al. (2003)	
	300	R	GTTTCATGGCACTCCCTTTCAAC		Seq	Lockyer et al. (2003)	
	ECD2	R	CTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGG		Seq	Littlewood et al. (2000)	

*Abreviações:* *cox1*, citocromo *c* oxidase subunidade 1; F, forward; R, reverse; Seq, sequenciamento.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação QIAquick (Qiagen Ltd., UK) seguindo o protocolo do fabricante e sequenciadas ambas fitas por GATC Biotech AG em Konstanz (Alemanha) e Macrogen Inc. (Spain). O sequenciamento foi realizado com o analisador Applied Biosystems 3730xl DNA, usando BigDye v.1.1 chemistry (ABI Perkin-Elmer, UK) como recomendado pelo fabricante. Os contíguos das sequências foram alinhados usando Mega v. 7 (KUMAR et al. 2016) e submetido à ferramenta de bioinformática BLAST (Ferramenta básica de alinhamento local) no GenBank ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) para verificar a identidade da sequência.

As sequências geradas foram alinhadas com as sequências atualmente disponíveis na base de dados GenBank para cada grupo (ver Tabela 1 no capítulo I e II para mais detalhes) usando MAFFT v.7 (KATOCH et al., 2019; KURAKU et al., 2013) com parâmetros de gap e executados online (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Dados sobre as abordagens e construção das árvores filogenéticas serão abordados em cada capítulo.



### 3. CAPÍTULO I –

## **DIVERSIDADE DE ESPÉCIES E ESTRATÉGIAS DE CICLO DE VIDA DE TREMATÓDEOS PROTERODIPLOSTOMÍDEOS (DIGENEA: PROTERODIPLOSTOMIDAE) NO BRASIL<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Artigo submetido à revista científica internacional Acta Tropica

## RESUMO

Proterodiplostomidae é uma família relativamente pequena de digenéticos parasitos exclusivamente com adultos em répteis piscívoros, seguindo um ciclo de vida típico de três hospedeiros. Dado o status protegido de seus hospedeiros definitivos, a diversidade de proterodiplostomídeos permanece consideravelmente inexplorada. Pouco se sabe sobre a filogenia e biologia deste grupo peculiar. Os dados das sequências para o gene 28S rDNA de apenas duas espécies identificadas em metacercárias isoladas estão disponíveis até o momento. Atualmente, os proterodiplostomídeos são considerados um grupo basal de Diplostomoidea Poirier, 1886, com base em suas associações aos hospedeiros definitivos. O presente estudo apresenta uma tentativa de entender melhor a diversidade de proterodiplostomídeos no Brasil, por meio da caracterização morfológica e molecular de isolados de adultos e metacercárias revelando a presença de oito espécies distintas. Isso permitiu ainda uma elucidação parcial do ciclo de vida de *Prolecithodiplostomum constrictum* Dubois, 1936. As afinidades filogenéticas de Diplostomoidea foram avaliadas com base em dados de sequências genéticas parciais de 28S rDNA. A parafilia de Diplostomidae e Strigeidae foi confirmada, no entanto, a posição basal da família Proterodiplostomidae foi rejeitada, dando uma nova visão da atual sistemática dos diplostomídeos.

**Palavras-chave:** Proterodiplostomidae, metacercárias, peixes de água doce.

## ABSTRACT

The Proterodiplostomidae is a relatively small family of digenean trematodes parasitic exclusively when adults in piscivorous reptiles following a typical three-host pattern life-cycles. Given the protected status of their definitive hosts the proterodiplostomids diversity remains considerably unexplored. Very little is known on the phylogeny and biology of this peculiar group. Sequence data for the large subunit nuclear ribosomal rRNA gene of only two identified species from metacercarial isolates are available so far. Currently, the proterodiplostomids are considered a basal group within the Diplostomoidea Poirier, 1886 based on their definitive host associations. The present study presents an attempt to better understand the proterodiplostomids diversity in Brazil, through Morphological and molecular characterisation of both adult and metacercarial isolates reveal the presence of eight distinct species. These further enabled a partial elucidation of the life-cycle of *Prolecithodiplostomum constrictum* Dubois, 1936. The phylogenetic affinities within the Diplostomoidea were further assessed based on sequence data from the partial large subunit nuclear rRNA gene sequences. The paraphyly of Diplostomidae and Strigidae was confirmed, however, the basal position of the Proterodiplostomidae was rejected giving a new look at the current structure of the diplostomoideans.

**Keywords:** Proterodiplostomidae, metacercariae, freshwater fishes.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A região Neotropical é a mais diversificada da Terra com numerosas espécies para serem descobertas (DOBSON et al., 2008). Aproximadamente metade das florestas tropicais do mundo ocorre na região neotropical. Estas florestas são reconhecidas por possuírem a maior diversidade de peixes de água doce, contabilizando aproximadamente 1/4 das espécies conhecidas (LUNDBERG et al., 2000; ALBERT & REIS, 2011), assim como aproximadamente 1/4 dos mamíferos, 1/5 dos pássaros, 1/10 dos répteis e anfíbios da diversidade global (PATTERSON, 1994; DINIZ et al., 2007; LUNDBERG et al., 2000; DUELLMAN, 1979). Apesar da grande diversidade de vertebrados na região Neotropical, suas respectivas faunas helmintológicas são pouco conhecidas. Há uma dificuldade em estimar a fauna parasitária na América do sul, pois menos de 5% da diversa fauna de peixes tem sido examinada para conhecimento da fauna parasitária (CHOUDHOURY et al., 2016). As metacercárias de espécies pertencentes as famílias Diplostomidae e Strigeidae (Diplostomoidea Poirier, 1886) maturam em vertebrados que se alimentam de peixes e são os trematódeos mais comuns e largamente distribuídos na região Neotropical.

Proterodiplostomidae Dubois, 1936 compreende um grupo relativamente pequeno de digenéticos que em estágio adulto parasitam exclusivamente répteis (NIEWIADOMSKA, 2002c). Os proterodiplostomídeos são os únicos a possuírem glândula paraprostática (DUBOIS, 1936b; NIEWIADOMSKA, 2002c), representando um órgão independente do tipo tubo ou bolsa na genitália terminal. O duto eferente paraprostático compreende um órgão independente do duto ejaculatório e útero, e como tal, representa o terceiro duto genital preenchido com a secreção das células glandulares que o envolvem (NIEWIADOMSKA, 2002c). Com base na especificidade ao hospedeiro, a família tem sido dividida em duas ‘supersubfamílias’: (i) parasitos de jacarés e quelônios (Proterodiplostomidi Dubois, 1936) e (ii) parasitos de cobras (Ophiodiplostomidi Dubois, 1936) (DUBOIS, 1938b, 1953). Dentro do atual conceito de Proterodiplostomidae cinco subfamílias são reconhecidas: Opisthiodiplostomatinae Dubois, 1936; Proalarioidinae Sudarikov, 1960; Massoprostatinae Yamaguti, 1958; Polycotylineae Monticelli, 1888 e Proterodiplostomatinae Dubois, 1936. A divisão das subfamílias é baseada na especificidade ao hospedeiro e caracteres morfológicos de espécimes adultos, incluindo formato e tamanho do órgão tribocítico, presença ou ausência de papilas nas bordas da fenda mediana do órgão tribocítico e a distribuição da vitelária. Os proterodiplostomídeos são bem representados nas regiões tropical e subtropical. Atualmente 17 gêneros são reconhecidos

dentro da família, das quais 11 apresentam espécies reportadas na América do Sul (NIEWIADOMSKA, 2002c; FERNANDES et al., 2014 - ver tabela 2 no tópico Resultados). No Brasil, 16 espécies de 10 gêneros têm sido reportadas, principalmente em espécimes adultos (ver Tabela 2 para detalhes a respeito de hospedeiros e localidades). Apesar de dados relativamente ricos sobre adultos proterodiplostomídeos, até o momento, os dados sobre as estratégias do ciclo de vida e morfologia dos estágios larvais são praticamente inexistentes.

O gênero-tipo *Proterodiplostomum* Dubois, 1936 atualmente compreende seis espécies relacionadas em crocodilianos e cobras exclusivamente na região Neotropical (DUBOIS, 1936b; NIEWIADOMSKA, 2002c). Cinco destas espécies foram reportadas em jacarés no Brasil (ver Tabela 2 em Resultados para detalhes sobre as espécies de hospedeiros de *Proterodiplostomum*). *Proterodiplostomum ophidium* representa o único membro do gênero conhecido de uma cobra, relatada apenas no México. As metacercárias identificadas como pertencentes à *Proterodiplostomum* tem sido relatadas em uma variedade de peixes, isto é Cypriniformes [*Algansea tincella* (Valenciennes) e *Goodea atripinnis* Jordan do estado do Guanajuato, México; *Aztecula sallaei* (Günther), *Girardinichthys multiradiatus* (Meck), *Go. atripinnis* e *Notropis sallei* (Günther) na bacia do rio Lerma-Santiago no estado do México)] e Atheriniformes [*Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes), *C. riojai* Solórzano & López no estado do México] (SALGADO-MALDONADO et al., 2001; PÉREZ-PONCE DE LEÓN et al. 2007).

Em contraste com o grande conjunto de dados de sequências geradas para diplostomídeos no mundo, estes dados para proterodiplostomídeos são praticamente ausentes. Estão disponíveis sequências de apenas duas das 44 espécies atualmente conhecidas e ambos isolados sequenciados representam estágios de metacercárias (HERNÁNDEZ-MENA et al., 2017; QUEIROZ et al., 2019). Hernández-Mena et al. (2017) testou a posição filogenética de proterodiplostomídeos dentro da superfamília Diplostomoidea com sequência referente uma metacercária progenética de *Crocodylicola pseudostoma* (Willemoes-Suhm, 1870) coletada em *Rhamdia guatemalensis* (Günther) (Siluriformes: Heptapteridae) no lago Catemaco, Veracruz, México. Mais recentemente, Queiroz et al. (2019) reportou *Heterodiplostomum lanceolatum* Dubois, 1936 em estágio de metacercária em sapos, *Leptodactylus podicipinus* (Cope, 1862) (Anura: Leptodactylidae) do Brasil. Ambos estudos reportaram relações irmãs entre Proterodiplostomidae e Diplostomidae Poirier, 1886 e ainda foi discutido a atual insatisfatória estrutura da superfamília. Apesar dos dados históricos e dos esforços recentes, ainda estamos longe de uma compreensão completa da diversidade da fauna neotropical de trematóides. Isto

é, em parte, um reflexo do baixo esforço amostral devido ao status protegido de muitos grupos importantes de hospedeiros.

Em uma pesquisa que avalia a diversidade de digenéticos no ecossistema de água doce brasileira, coletamos metacercárias e adultos de proterodiplostomídeos de uma ampla gama de hospedeiros incluindo dados para espécies de peixes, répteis e aves. Aqui nós providenciamos descrições morfológicas junto a dados moleculares para oito espécies de proterodiplostomídeos do Brasil. Adicionamos dados sobre a diversidade de proterodiplostomídeos e as relações de espécies entre Diplostomoidea através da elucidação parcial do ciclo de vida de *Prolecithodiplostomum constrictum* Dubois, 1936 com base em dados morfológicos e sequências genéticas, lançando luz na importância de caracteres morfológicos do estágio de metacercária. Os principais caracteres morfológicos para os diplostomídeos são discutidos à luz de sua diversificação e a metacercária do tipo ‘proterodiplostomulum’ é revalidada.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Como citado anteriormente, estão incluídos neste tópico apenas as especificações referentes a este capítulo, uma vez que todos outros procedimentos utilizados estão descritos em “Material e métodos gerais”.

### 3.2.1 Dados Morfológicos

Os espécimes adultos usados para análise morfológica foram corados com aceto-carmim de ferro, desidratados em série ascendente de etanol (70–100%), clarificados em dimetil ftalato e montados em bálsamo do Canadá. Os espécimes montados foram examinados através de microscópio de luz Zeiss e desenhos detalhados foram produzidos com auxílio do tubo de desenho (câmara clara) acoplado.

### 3.2.2 Dados moleculares e análises filogenéticas

Os fragmentos parciais de *cox1* foram amplificados usando os conjuntos de iniciadores degenerados e específicos para diplostomídeos. As sequências geradas foram depositadas na base de dados GenBank (ver Tabela 1 para os códigos de acesso).

As relações filogenéticas foram analisadas para Proterodiplostomidae especificamente com os conjuntos de dados de 28S e *cox1*. As relações interespecíficas entre os Diplostomoidea foram analisadas em um conjunto de dados amplo incluindo as novas sequências junto às sequências atualmente disponíveis para 98 diplostomídeos. Além disso, as relações intra e interespecíficas dentro dos Proterodiplostomidae foram avaliadas em um conjunto de dados menor para 28S para 12 táxons, incluindo 14 sequências recém-geradas e os únicos membros publicados anteriormente da família *Heterodiplostomum lanceolatum* Dubois, 1936 (MN149353) e *Crocodilicola pseudostoma* (MF398328). As relações intraespecíficas entre os proterodiplostomídeos foram posteriormente analisadas em um conjunto de dados para o gene *cox1* compreendendo 8 táxons, incluindo 9 sequências recém-geradas e uma anteriormente publicadas de *Crocodilicola pseudostoma* (Willemoes-Suhm, 1870) (MF398317) (592 nt). *Apatemon gracilis* (Strigeidae) e *Ornithodiplostomum scardinii* (Diplostomidae) foram utilizados como grupo externo em ambas análises.

As relações filogenéticas foram avaliadas usando a abordagem de inferência bayesiana (IB). Antes desta análise o jModelTest 2.1.8 (DARRIBA et al., 2012) foi utilizado para selecionar os modelos de evolução das sequências sob Critério de Informação Bayesiana (BIC).

As análises de inferência bayesiana foram realizadas por meio do MrBayes v.3.2.6 (RONQUIST et al., 2012) na plataforma CIPRES Science Gateway v.3.3 ([http://www.phylo.org/sub\\_sections/portal/](http://www.phylo.org/sub_sections/portal/)) (MILLER et al., 2010) em execução on-line usando MrBayes (3.2.6) na ferramenta XSEDE. As análises foram processadas em quatro cadeias amostradas a cada 1.000 de 10.000.000 gerações. O descarte de uma fração ‘burn-in’ foi definido para as primeiras 25% árvores amostradas na qual foram descartadas antes das análises. A topologia consenso e o suporte nodal foram estimados como valores de probabilidade posterior (HUELSENBECK et al., 2001) foram calculados das árvores remanescentes. FigTree v.1.4.2 (RAMBAUT, 2012) foi utilizado para visualizar as árvores.



**Tabela 1.** Dados para espécies incluídos nas análises de Proterodiplostomidae.

Espécie	Isolado	E	Espécie de hospedeiro	Localidade	Número de acesso GenBank		Referências
					<i>cox1</i>	28S	
<i>Proterodiplostomum longum</i> Dubois, 1936	–	A	<i>Caiman latirostris</i> (Daudin)	Rio Guandu, Rio de Janeiro, Brasil	–	MT187589	Presente estudo
<i>Proterodiplostomum</i> sp. 1	–	M	<i>Trachydoras paraguayensis</i> (Eigenmann & Ward)	Rio Paraná, Paraná, Brasil	MT185362	MT187592	Presente estudo
<i>Proterodiplostomum</i> sp. 1	–	M	<i>Trachelyopterus galeatus</i> Linnaeus	Rio Paraná, Paraná, Brasil	MT185361	MT187591	Presente estudo
<i>Proterodiplostomum</i> sp. 1	–	M	<i>Trachydoras paraguayensis</i> (Eigenmann & Ward)	Rio Paraná, Paraná, Brasil	MT185363	MT187590	Presente estudo
<i>Proterodiplostomum</i> sp. 2	–	M	<i>Pimelodus fur</i> (Lütken)	Rio Miranda, Mato Grosso do Sul, Brasil	MT185364	MT187593	Presente estudo
<i>Proterodiplostomum</i> sp. 3	–	M	<i>Hemiodontichthys acipenserinus</i> (Kner)	Rio Jari, Amapá, Brasil	–	MT87594	Presente estudo
<i>Proterodiplostomum</i> sp. 3	–	M	<i>Hemiodontichthys acipenserinus</i> (Kner)	Rio Jari, Amapá, Brasil	MT185365	MT87596	Presente estudo
<i>Proterodiplostomum</i> sp. 3	–	M	<i>Hemiodus unimaculatus</i> (Bloch)	Rio Jari, Amapá, Brasil	MT185366	MT87595	Presente estudo
<i>Proterodiplostomum</i> sp. 3	–	M	<i>Phalacrocorax brasilianus</i> (Gmelin)	Rio Jari, Amapá, Brasil	–	MT187597	Presente estudo
Proterodiplostomidae gen. sp. 1	–	M	<i>Cichla monoculus</i> Agassiz	Rio Jari, Amapá, Brasil	MT185367	MT187598	Presente estudo
Proterodiplostomidae gen. sp. 2	–	M	<i>Cichla monoculus</i> Agassiz	Rio Jari, Amapá, Brasil	–	MT187599	Presente estudo
Proterodiplostomidae gen. sp. 3	–	M	<i>Hemiodontichthys acipenserinus</i> (Kner)	Rio Jari, Amapá, Brasil	–	MT187600	Presente estudo
<i>Prolecithodiplostomum constrictum</i> Dubois, 1936	–	A	<i>Paleosuchus trigonatus</i> (Schneide)	Rio Jari, Amapá, Brasil	MT185369	MT187602	Presente estudo

**Tabela 1. (continuação)**

Espécie	Isolado	E	Espécie de hospedeiro	Localidade	Número de acesso GenBank		Referências
					<i>cox1</i>	<b>28S</b>	
<i>Prolecithodiplostomum constrictum</i>	–	M	<i>Cyphocarax leucostictus</i> (Eigenmann & Eigenmann)	Rio Jari, Amapá, Brasil	MT185368	MT187601	Presente estudo
<i>Crocodilicola pseudostoma</i> (Willemoes-Suhm, 1870)	85	PM	<i>Rhamdia guatemalensis</i> (Günther)	Lago Catemaco, Veracruz, México	MF398317	–	Hernández-Mena et al. (2017)
	126	PM	<i>Rhamdia guatemalensis</i> (Günther)	Lago Catemaco, Veracruz, México	–	MF398328	Hernández-Mena et al. (2017)
<i>Heterodiplostomum lanceolatum</i> Dubois, 1936	Selviria	M	<i>Leptodactylus podicipinus</i> (Cope)	Mato Grosso do Sul, Brasil	–	MN149353	Queiroz et al. (2019)
<i>Apatemon gracilis</i> (Rudolphi)	AGTAK10	C	<i>Radix balthica</i> (Linnaeus)	Lago Takvatn, Noruega	KY513225	KY513176	Soldanova et al. (2017)
<i>Ornithodiplostomum scardinii</i> (Schulman in Dubinin, 1952)	OSSE1	M	<i>Scardinius erythrophthalmus</i> (Linnaeus)	Lago Mácha, República Tcheca	KX931425	KX931427	Stoyanov et al. (2017)

Abreviações: E, estágio do ciclo de vida; A, adulto; M, metacercária; PM, metacercária progenética; C, cercária.

### 3.3 RESULTADOS

Dos 1140 espécimes de peixes examinados compreendendo 145 espécies de 27 famílias e 7 ordens, foram encontrados um total de 14 espécimes infectados com proterodiplostomídeos. Um total de 9 espécies de peixes, compreendendo 7 famílias de 3 ordens foram descobertos infectados, isto é, Characiformes: *Astyanax asuncionensis* Géry (Characidae), *Cyphocharax leucostictus* (Eigenmann & Eigenmann) (Curimatidae), *Hemiodus unimaculatus* (Bloch) (Hemiodontidae); Cichliformes: *Cichla monoculus* Agassiz (Cichlidae); Siluriformes: *Tatia* sp. (Auchenipteridae), *Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus), *Trachydoras paraguayensis* (Eigenmann & Ward) (Doradidae), *Hemiodontichthys acipenserinus* (Kner) (Loricariidae), *Pimelodus fur* (Lütken) (Pimelodidae) e uma espécie de ave *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin) (Aves: Phalacrocoracidae). Adicionalmente, espécimes adultos de proterodiplostomídeos foram coletados em *Caiman latirostris* (Daudin) e *Paleosuchus trigonatus* (Schneider) (Reptilia: Alligatoridae) (ver Tabela 1 para detalhes dos hospedeiros examinados e localidades de origem; Tabela 2 para detalhes dos registros prévios).

#### 3.3.1 Dados moleculares

Os iniciadores ‘universais’ de Folmer têm sido provados como problemáticos devido a incompatibilidades nos locais de ligação do iniciador ao se aplicar para taxa de platelmintos (VANHOVE et al., 2013; VAN STEENKISTE et al., 2015). Ambos iniciadores aqui utilizados, degenerados e específicos para diplostomídeos, visam amplificar a região de código de barras para um número limitado de táxons abrangendo uma região com menor variação nucleotídica (VAN STEENKISTE et al., 2015) e a ‘universal’. Estes iniciadores falharam na amplificação para *Proterodiplostomum longum* (Brandes, 1888), Proterodiplostomidae gen. sp. 2 e Proterodiplostomidae gen. sp. 3. No presente estudo fornecemos dados da sequência *cox1*, consistentes com a biblioteca de referência atualmente disponível para os diplostomoídeos com o objetivo de ajudar estudos adicionais na elucidação de relações interespecíficas entre os proterodiplostomídeos.

Sequências parciais de *cox1* e 28S rDNA (D1-D3 domínio) foram geradas para 14 espécimes de Proterodiplostomidae. Estes dados se referem a 12 metacercárias obtidas de peixes como hospedeiros intermediário e dois espécimes adultos obtidas de répteis como hospedeiro definitivo (*C. latirostris* e *P. trigonatus*).

**Tabela 2.** Lista de espécie de proterodiplostomídeos reportados na América do Sul.

Espécie	E*	Ordem e família do hospedeiro	Espécie de hospedeiro	Localidade	Referência
<i>Cheloniodiplostomum argentinensis</i> Palumbo & Diaz, 2018	A	Testudines: Chelidae	<i>Hydromedusa tectifera</i> Cope	Buenos Aires, Argentina	Palumbo & Diaz (2018)
	A	Testudines: Chelidae	<i>Phrynops hilarii</i> (Dumeril & Bibron)	Buenos Aires, Argentina	Palumbo & Diaz (2018)
<i>Cheloniodiplostomum breve</i> (MacCallum, 1921) Sudarikov, 1960	A	Testudines: Chelidae	<i>Phrynops geoffroanus</i> (Schweigger)	Colômbia	Dubois (1978)
<i>Cheloniodiplostomum testudinis</i> (Dubois, 1936) Sudarikov, 1960	A	Testudines: Chelidae	<i>Hydromedusa tectifera</i>	Buenos Aires, Argentina	Palumbo & Diaz (2018)
	A	Testudines: Chelidae	<i>Phrynops hilarii</i>	Rio Grande do Sul, Brasil	Mascarenhas et al. (2016)
	A	Testudines: Chelidae	<i>Phrynops hilarii</i>	Buenos Aires, Argentina	Lombardero & Moriena (1977); Fernandes & Kohn (2014); Palumbo & Diaz (2018)
	A	Testudines: Chelidae	<i>Testudo</i> sp.	Brasil	Dubois (1936a, b, 1938a, b, 1944, 1970b); Hughes (1942); Yamaguti (1958); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Skrjabin (1960); Fernandes & Kohn (2014)
<i>Cheloniodiplostomum</i> sp.	A	Testudines: Chelidae	<i>Acanthochelys spixii</i> (Duméril & Bibron)	Rio Grande do Sul, Brasil	Mascarenhas et al. (2016)
	A	Testudines: Chelidae	<i>Phrynops hilarii</i>	Rio Grande do Sul, Brasil	Bernardon et al. (2013)
<i>Crocodylicola pseudostoma</i> (Willemoes-Suhm, 1870) Poche, 1926	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman</i> sp.	Brasil	Viana (1924); Dubois (1938b); Travassos et al. (1969); Fernandes & Kohn (2014)
	M	Siluridiformes: Pimelodidae	<i>Hemisorubim platyrhynchos</i> (Valenciennes)	Paraná, Brasil	Guidelli et al. (2003)
	A	Siluridiformes: Loricariidae	<i>Loricariichthys platymetopon</i> Isbrücker & Nijssen	Paraná, Brasil	Ferrari-Hoeinghaus et al. (2007)
	M	Siluridiformes: Heptapteridae	<i>Rhamdia quelen</i> (Quoy & Gaimard)	Brasil	Conroy & Conroy (1986)

**Tabela 2. (continuação)**

<b>Espécie</b>	<b>E*</b>	<b>Ordem e família do hospedeiro</b>	<b>Espécie de hospedeiro</b>	<b>Localidade</b>	<b>Referência</b>
<i>Crocodilicola</i> sp.	M	Siluriformes: Auchenipteridae	<i>Auchenipterus osteomystax</i> (Miranda Ribeiro)	Paraná State, Brazil	Tavernari et al. (2009); Yamada et al. (2017)
	M	Gymnotiformes: Gymnotidae	<i>Gymnotus carapo</i> Linnaeus	Paraná State, Brazil	Isaac et al. (2004); Takemoto et al. (2009)
	M	Gymnotiformes: Gymnotidae	<i>Gymnotus inaequilabiatus</i> (Valenciennes)	Paraná State, Brazil	Isaac et al. (2004)
	M	Gymnotiformes: Gymnotidae	<i>Gymnotus sylvius</i> Albert & Fernandes-Matioli	Paraná State, Brazil	Isaac et al. (2004)
<i>Cystodiplostomum hollyi</i> Dubois, 1936	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus</i> (Linnaeus)	Brasil	Dubois (1936a, b, 1938a, b, 1944, 1970a, b); Hughes et al. (1942); Yamaguti (1958); Skrjabin (1960); Nasir & Diaz (1971); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus</i>	São Paulo, Brasil	Ruiz & Rangel (1954); Skrjabin (1960); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus</i>	Venezuela	Dubois (1970a); Nasir & Diaz (1971); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman latirostris</i> (Daudin)	Brasil	Dubois (1938a, b, 1948, 1970b); Hughes (1942); Yamaguti (1958); Skrjabin (1960); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman yacare</i> (Daudin)	Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil	Catto & Amato (1994a, b); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman</i> sp.	Rio de Janeiro, Brasil	Noronha et al. (2009)
<i>Cystodiplostomum</i> sp.	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman yacare</i>	Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil	Brooks et al. (1992)

**Tabela 2. (continuação)**

<b>Espécie</b>	<b>E*</b>	<b>Ordem e família do hospedeiro</b>	<b>Espécie de hospedeiro</b>	<b>Localidade</b>	<b>Referência</b>
<i>Herpetodiplostomum caimancola</i> (Dollfus, 1935) Dubois, 1936	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus</i>	Brasil	Dubois (1936b, 1938 a, b, 1944, 1970a, b, 1979); Hughes et al. (1942); Yamaguti (1958); Skrjabin (1960); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus</i>	Venezuela	Nasir & Diaz (1971); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus fuscus</i> (Cope)	Brasil	Dubois (1970b)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman latirostris</i>	Brasil	Dollfus (1935); Dubois (1936b, 1938a, b, 1944, 1970b); Hughes (1942); Yamaguti (1958); Skrjabin (1960); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
<i>Herpetodiplostomum caimancola</i> (Dollfus, 1935) Dubois, 1936	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman yacare</i>	Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil	Catto & Amato (1994a, b); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman</i> sp.	Rio de Janeiro, Brasil	Noronha et al. (2009)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Melanosuchus niger</i> (Spix)	Brasil	Dubois (1936b, 1938a, b, 1944, 1970b); Hughes (1942); Yamaguti (1958); Skrjabin (1960); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
<i>Herpetodiplostomum gymnoti</i> Szidat, 1969	PM	Siluridiformes: Cillichthyidae	<i>Hoplosternum littorale</i> (Hancock)	Rio de Janeiro, Brasil	Abdallah et al. (2006)
	M	Gymnotiformes: Gymnotidae	<i>Gymnotus carapo</i> Linnaeus	Argentina	Szidat (1969)
	M	Siluriformes: Pimelodidae	<i>Iheringichthys labrosus</i> Lütken	Paraná, Brasil	Moreira et al. (2005)
<i>Herpetodiplostomum</i> sp.	M	Characiformes: Characidae	<i>Astyanax altiparanae</i> Garutti & Britski	Paraná, Brasil	Lizama et al. (2008); Takemoto et al. (2009)
	M	Cichliformes: Cichlidae	<i>Astronotus ocellatus</i> Agassiz	Amapá, Brasil	Tavares-Dias et al. (2011)

**Tabela 2. (continuação)**

<b>Espécie</b>	<b>E*</b>	<b>Ordem e família do hospedeiro</b>	<b>Espécie de hospedeiro</b>	<b>Localidade</b>	<b>Referência</b>
<i>Herpetodiplostomum</i> sp.	M	Gymnotiformes: Gymnotidae	<i>Gymnotus carapo</i>	Paraná, Brasil	Isaac et al. (2004); Takemoto et al. (2009)
	M	Gymnotiformes: Gymnotidae	<i>Gymnotus inaequilabiatus</i> (Valenciennes)	Paraná, Brasil	Isaac et al. (2004)
	M	Gymnotiformes: Gymnotidae	<i>Gymnotus sylvius</i> Albert & Fernandes-Matioli	Paraná, Brasil	Isaac et al. (2004)
	M	Siluriformes: Pimelodidae	<i>Iheringichthys labrosus</i>	Paraná State, Brasil	Takemoto et al. (2009)
	M	Characiformes: Anostomidae	<i>Leporinus friderici</i> (Bloch)	Paraná State, Brasil	Guidelli et al. (2006); Takemoto et al. (2009)
	M	Characiformes: Anostomidae	<i>Leporinus lacustris</i> Amaral Campos	Paraná State, Brasil	Guidelli et al. (2006)
	M	Characiformes: Anostomidae	<i>Megaleporinus elongatus</i> (Valenciennes)	Paraná State, Brasil	Takemoto et al. (2009)
	M	Characiformes: Anostomidae	<i>Megaleporinus obtusidens</i> (Valenciennes)	Paraná State, Brasil	Takemoto et al. (2009)
<i>Heterodiplostomum helicopsis</i> Mane-Garzon & Alonso, 1976	A	Squamata: Colubridae	<i>Helicops infrataeniatus</i> Jan	Uruguai	Mañé-Garzón & Alonso (1979); Fernandes & Kohn (2014)
<i>Heterodiplostomum lanceolatum</i> Dubois, 1936	A	Squamata: Viperidae	<i>Bothrops alternata</i> Duméril, Bibron & Duméril	Argentina	Poumarau, (1968); Lunaschi & Sutton (1985); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Coluber</i> sp.	Paraná, Brasil	Dubois (1936a, b, 1938a, b, 1953, 1970b, 1988); Hughes (1942); Yamaguti (1958); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Helicops infrataeniatus</i> Jan	Argentina	Lunaschi & Sutton (1985); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Helicops leopardinus</i> (Schlegel)	Argentina	Poumarau (1968); Lunaschi & Sutton (1985); Lunaschi & Drago (2010); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Hydrodynastes gigas</i> (Duméril, Bibron & Duméril)	Formosa, Argentina	Poumarau (1968); Lunaschi & Sutton (1985); Lunaschi & Drago (2010); Fernandes & Kohn (2014)

**Tabela 2. (continuação)**

<b>Espécie</b>	<b>E*</b>	<b>Ordem e família do hospedeiro</b>	<b>Espécie de hospedeiro</b>	<b>Localidade</b>	<b>Referência</b>
<i>Heterodiplostomum lanceolatum</i>	A	Squamata: Colubridae	<i>Hydrodynastes gigas</i>	Concepcion, Paraguai	Dubois (1938b, 1988); Fernandes & Kohn (2014)
	M	Anura: Leptodactilidae	<i>Leptodactylus latrans</i> (Steffen)	Uruguai	Mañé-Garzón & Alonso (1979)
	M	Anura: Leptodactilidae	<i>Leptodactylus podicipinus</i> (Cope)	Minas Gerais, Brasil	Queiroz et al. (2019)
	A	Anura: Leptodactilidae	<i>Liophis poecilogyrus reticulatus</i>	Presidente Hayes, Paraguai	Dubois (1938b, 1988); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Palusophis bifossatus</i> (Raddi)	Brasil	Dubois (1988)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Palusophis bifossatus</i>	Paraguai	Dubois (1986); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Xenodon guentheri</i> Boulenger	Paraná, Brasil	Ruiz & Rangel (1954); Skrjabin (1960); Dubois (1970b); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Fernandes & Kohn (2014)
<i>Massoprostatum longum</i> Caballero, 1948	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus fuscus</i>	Colômbia	Álvarez et al. (2005); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
<i>Mesodiplostomum gladiolum</i> Dubois, 1936	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman</i> sp.	Brasil	Dubois (1936a, 1938b, 1944, 1953); Skrjabin (1960); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Melanosuchus niger</i>	Brasil	Dubois (1936b, 1938a, b, 1953, 1970b); Hughes (1942); Yamaguti (1958); Skrjabin (1960); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
<i>Ophiodiplostomum ancyloides</i> (Dubois, 1936) Dubois, 1979	A	Squamata: Colubridae	<i>Coluber</i> sp.	Rio Grande do Sul, Brasil	Dubois (1936a, b, 1938a, b, 1970b, 1979); Hughes (1942); Ruiz & Rangel (1954); Yamaguti (1958); Skrjabin (1960); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Fernandes & Kohn (2014)
<i>Ophiodiplostomum spectabile</i> Dubois, 1936	M	Anura: Hylidae	<i>Boana albomarginata</i> (Spix)	Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil	Dubois (1970a); Noronha et al. (2009)



**Tabela 2. (continuação)**

<b>Espécie</b>	<b>E*</b>	<b>Ordem e família do hospedeiro</b>	<b>Espécie de hospedeiro</b>	<b>Localidade</b>	<b>Referência</b>
<i>Ophiodyplostomum spectabile</i>	M	Anura: Hylidae	<i>Boana lundii</i> (Burmeister)	Minas Gerais, Brasil	Dubois (1970a); Noronha et al. (2009)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Coluber</i> sp.	Brasil	Dubois (1936a, 1938b); Hughes (1942); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Squamata: Viperidae	<i>Crotalus durissus</i> Linnaeus	Brasil	Pinto et al. (2012b); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Erythrolamprus miliaris</i> (Linnaeus)	Minas Gerais, Brasil	Pinto et al. (2012b); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Erythrolamprus miliaris</i>	Rio Grande do Sul, Brasil	Ruiz & Rangel (1954); Yamaguti (1958); Skrjabin (1960); Dubois (1970b); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Erythrolamprus poecilogyrus</i> (Wied-Neuwied)	Brasil	Ruiz & Rangel (1954); Skrjabin (1960); Dubois (1970b); Pinto et al. (2012b); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Erythrolamprus reginae</i> (Linnaeus)	Brasil	Pinto et al. (2012b); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Erythrolamprus typhlus</i> (Linnaeus)	Brasil	Pinto et al. (2012b); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Squamata: Boidae	<i>Eunectes deschauenseei</i> Dunn & Conant	Brasil	Pinto et al. (2012b); Fernandes & Kohn (2014)
	M	Anura: Leptodactylidae	<i>Leptodactylus latrans</i> (Steffen)	Minas Gerais, Brasil	Dubois (1970a); Noronha et al. (2009)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Palusophis bifossatus</i> (Raddi)	Brasil	Dubois (1936b, 1938a, b, 1970b); Hughes (1942); Yamaguti (1958); Skrjabin (1960); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Pinto et al. (2012b); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Philodryas</i> sp.	Argentina	Lunaschi & Drago (2010); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Squamata: Colubridae	<i>Xenodon merremi</i> (Wagler)	Minas Gerais, Brasil	Dubois (1970a, b); Noronha et al. (2009); Pinto et al. (2012b); Fernandes & Kohn (2014)

**Tabela 2. (continuação)**

<b>Espécie</b>	<b>E*</b>	<b>Ordem e família do hospedeiro</b>	<b>Espécie de hospedeiro</b>	<b>Localidade</b>	<b>Referência</b>
<i>Ophiodiplostomum</i> sp.	A	Squamata: Colubridae	<i>Xenodon merremi</i>	Minas Gerais, Brasil	Noronha et al. (2009)
	A	Squamata	“Ophidia” Latreille	Angra dos Reis, Brasil	Noronha et al. (2009)
	A	Squamata	“Ophidia” Latreille	Minas Gerais, Brasil	Noronha et al. (2009)
<i>Paradiplostomum abbreviatum</i> (Brandes, 1888) La Rue, 1926	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman latirostris</i>	Formosa, Argentina	Lunaschi & Sutton (1990); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus</i>	Brasil	Dubois (1936b, 1938a, b, 1944, 1953, 1970b); Hughes (1942); Yamaguti (1958); Skrjabin (1960); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Tellez et al. (2003); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman</i> sp.	Brasil	Dubois (1938b); Viana (1924); Hughes (1942); Skrjabin (1960); Tellez et al. (2013)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman yacare</i>	Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil	Catto & Amato (1994a, b); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
<i>Paradiplostomum</i> sp.	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman</i> sp.	Mato Grosso do Sul, Brasil	Brooks et al. (1992)
<i>Parvaprostatum synbranchi</i> Fernandez, Tourne & Guerrero, 2019	A	Synbranchiformes: Synbranchidae	<i>Synbranchus marmoratus</i> Bloch	Maldonado, Uruguay	Fernandez et al. (2019)
<i>Prolecithodiplostomum constrictum</i> Dubois, 1936	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus fuscus</i>	Brasil	Thatcher (1993)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus fuscus</i>	Colômbia	Álvarez et al. (2005); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus</i>	Brasil	Dubois (1936a, b, 1938a, b, 1953, 1970a, b); Hughes (1942); Yamaguti (1958); Skrjabin (1960); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman yacare</i>	Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil	Catto & Amato (1994a, b); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)

**Tabela 2. (continuação)**

<b>Espécie</b>	<b>E*</b>	<b>Ordem e família do hospedeiro</b>	<b>Espécie de hospedeiro</b>	<b>Localidade</b>	<b>Referência</b>
<i>Prolecithodiplostomum constrictum</i>	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman</i> sp.	Brasil	Ruiz & Rangel (1954); Skrjabin (1960); Travassos et al. (1969); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman</i> sp.	Rio de Janeiro, Brasil	Noronha et al. (2009)
<i>Prolecithodiplostomum</i> sp.	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman yacare</i>	Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil	Brooks et al. (1992)
<i>Proterodiplostomum breve</i> Catto & Amato, 1994	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman yacare</i>	Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil	Catto & Amato (1994a, b); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
<i>Proterodiplostomum globulare</i> Catto & Amato, 1994	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman yacare</i>	Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil	Catto & Amato (1994a, b); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
<i>Proterodiplostomum longum</i> (Brandes, 1888) Dubois, 1936	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus</i>	Brasil	Dubois (1970a, b); Tellez et al. (2013); Noronha et al. (2009)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus</i>	Venezuela	Diaz & Nasir (1969); Nasir & Diaz (1971); Diaz-Ungria (1973); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman yacare</i>	Concepcion, Paraguay	Dubois (1988); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman yacare</i>	Peru	Tellez et al. (2003)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman</i> sp.	Brasil	Viana (1924); Dubois (1936a, 1938b, 1953); Hughes (1942); Skrjabin (1960); Travassos et al. (1969); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Melanosuchus niger</i>	Brasil	Dubois (1936, 1938a, b, 1970a, b); Hughes (1942); Yamaguti (1958); Skrjabin (1960); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Tellez et al. (2013); Noronha et al. (2009); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Paleosuchus palpebrosus</i> (Cuvier)	Brasil	Dubois (1938a, b); Skrjabin (1960); Tellez et al. (2013)

**Tabela 2. (continuação)**

<b>Espécie</b>	<b>E*</b>	<b>Ordem e família do hospedeiro</b>	<b>Espécie de hospedeiro</b>	<b>Localidade</b>	<b>Referência</b>
<i>Proterodiplostomum longum</i>	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Paleosuchus</i> sp.	Brasil	Dubois (1936, 1938b); Hughes (1942); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
<i>Proterodiplostomum medusae</i> (Dubois, 1936) Caballero, Hidalgo & Grocott, 1937	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus</i>	Brasil	Dubois (1936, 1938b, 1944, 1970a); Skrjabin (1960); Tellez et al. (2013); Noronha et al. (2009); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus</i>	Venezuela	Nasir & Rodrigues (1967); Diaz-Ungria (1973); Thatcher (1993); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman yacare</i>	Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil	Catto & Amato (1994a, b); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman</i> sp.	Brasil	Ruiz & Rangel (1954); Skrjabin (1960); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
<i>Proterodiplostomum tumidulum</i> Dubois, 1936	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus</i> (Linnaeus)	Brasil	Dubois (1936a, b, 1938a, b, 1970a, b); Hughes (1942); Yamaguti (1958); Skrjabin (1960); Travassos et al. (1969); Thatcher (1993); Tellez et al. (2013); Noronha et al. (2009); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman crocodilus fuscus</i>	Brasil	Thatcher (1993)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman yacare</i>	Brasil	Catto & Amato (1994 a, b); Tellez et al. (2013); Fernandes & Kohn (2014)
	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Paleosuchus palpebrosus</i>	Brasil	Dubois (1938b); Tellez et al. (2013)
<i>Proterodiplostomum</i> sp.	A	Crocodylia: Alligatoridae	<i>Caiman</i> sp.	Brasil	Brooks et al. (1992); Tellez et al. (2013)

*Abreviações:* E, Estágios do ciclo de vida; A, adulto; M, metacercária.

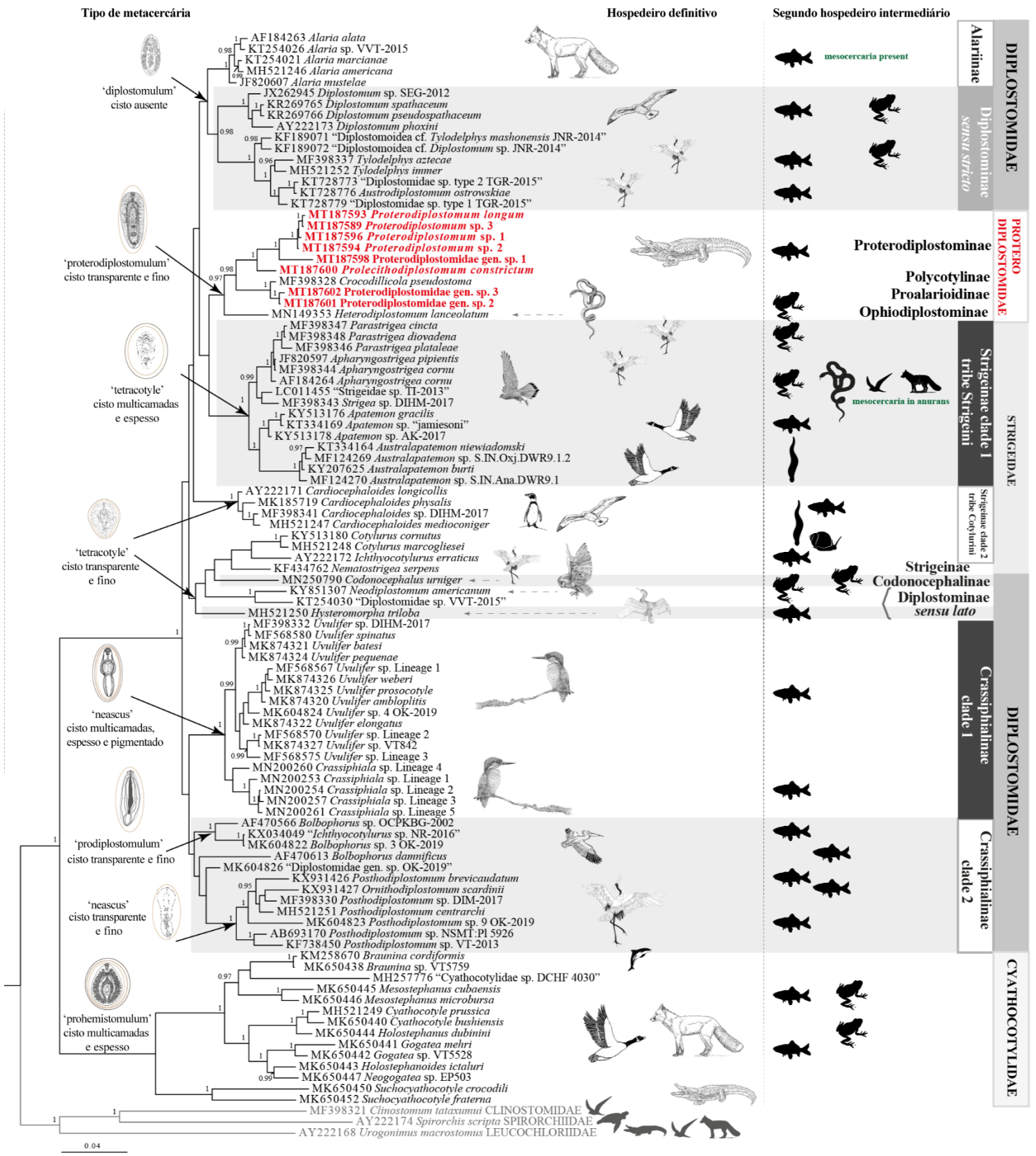
As sequências obtidas para 28S rDNA apresentaram o comprimento de 1123–1260 pb. A amplificação bem-sucedida com os iniciadores específicos para diplostomídeos e degenerados para *cox1* foi alcançada apenas em 9 das amostras e apresentou 592-665 pb de comprimento.

### 3.3.2 Relações entre Diplostomoidea

Os resultados da análise de BI para relações filogenéticas entre Diplostomoidea são apresentados na Figura 1. As sequências recém-geradas agruparam em um clado monofilético fortemente suportado, juntamente com as outras sequências para proterodiplostomídeos atualmente disponíveis no GenBank.

Dentro do clado Proterodiplostomidae, *Heterodiplostomum lanceolatum* foi recuperado como o primeiro divergente. Os dois isolados recuperados de *Cichla monoculus* e de *Hemiodontichthys acipenserinus* agruparam em um subclado com o máximo apoio, juntamente com *Crocodilicola pseudostoma*.

Sob a atual amostragem de táxons, a não monofilia de Diplostomidae e Strigeidae foi confirmada, bem como descrita em prévios estudos moleculares (HERNÁNDEZ-MENA et al. 2017; LOCKE et al. 2018). Os membros de Diplostomidae agruparam-se em dois grandes grupos, embora com pouco suporte estatístico: (i) Alariinae + Diplostominae *sensu stricto*; e (ii) Crassiphialinae. Alariinae ficou alocado como clado irmão à Diplostominae *sensu stricto* e os representantes de Crassiphialinae agruparam em dois subclados irmãos, isto é, (i) um clado composto por membros parasitos de Alcedinidae: *Uvulifer* + *Crassiphiala* [= Crassiphialinae do clado 1 *sensu* ACHATZ et al. (2019a)] e (ii) um clado composto por membros parasitos de Pelecaniformes e Ardeae: *Bolbophorus* + *Posthodiplostomum* + *Ornithodiplostomum* [= Crassiphialinae clado 2 *sensu* ACHATZ et al. (2019a)]. *Hysteromorpha triloba* + *Neodiplostomum americanum* + um isolado diplostomídeo não identificado ficaram agrupados separados de Diplostominae (*s.s.*) no clado multi táxon mal suportado juntamente com *Codonocephalus urniger* + os estrigeídeos *Nematostrigea serpens* + *Ichthyocotylurus erraticus* + *Cotylurus* spp. Os outros membros de Strigeidae se agruparam adicionalmente em dois cladros fortemente suportados: (i) clado 1 constituído por *Parastrigea* + *Apharyngostrigea* + *Strigea* + *Australapatemon*; e (ii) clado 2 composto apenas por representantes de *Cardiocephaloides*, ambos cladros correspondem respectivamente às tribos Strigeini e Cotylurini atribuídas anteriormente com pequenas alterações a serem aqui discutidas. Apesar do baixo suporte, os Proterodiplostomidae emergiram como um parente mais próximo do clado ‘Strigeini’.



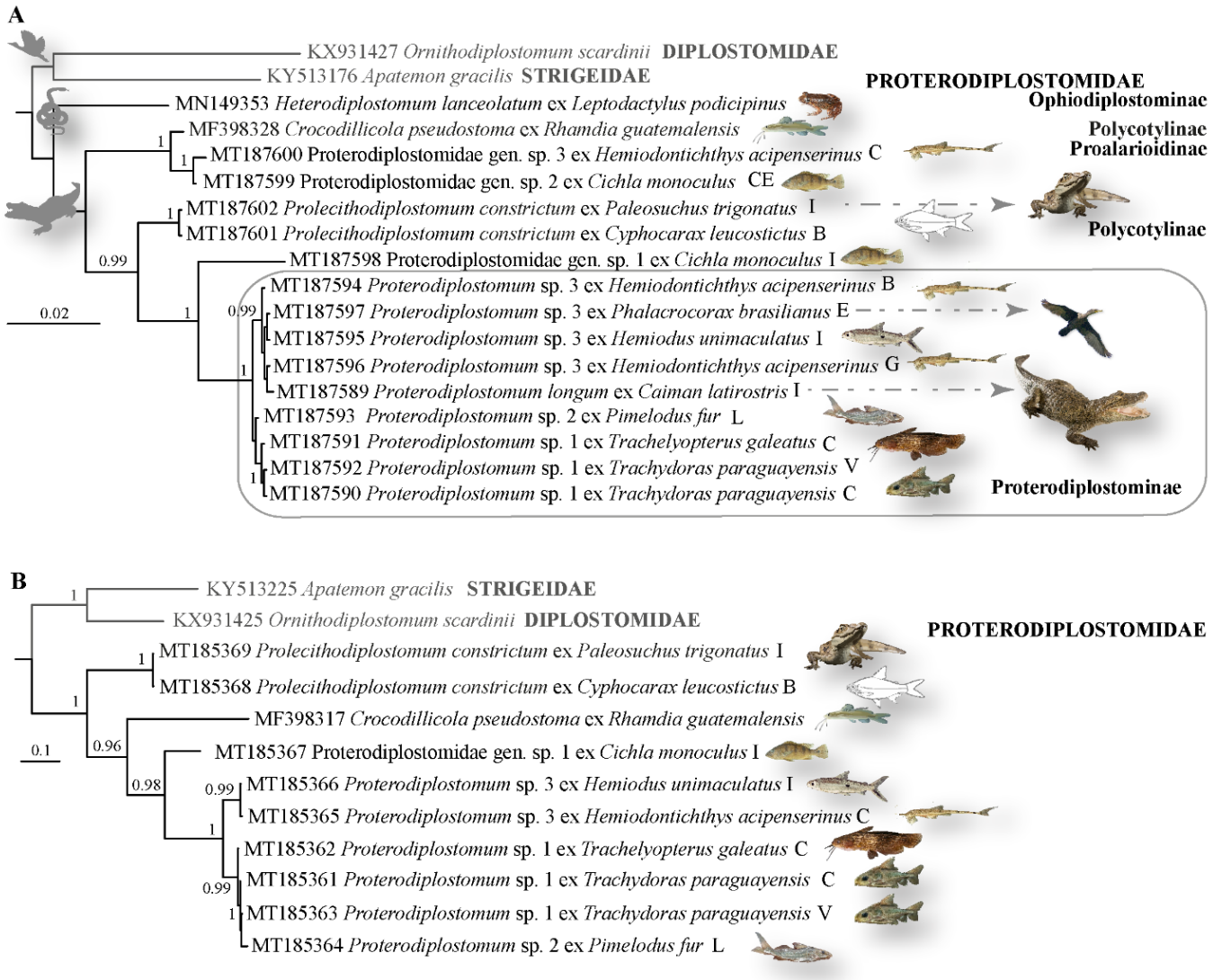
- |  |                    |  |           |  |                 |  |              |
|--|--------------------|--|-----------|--|-----------------|--|--------------|
|  | Mamíferos          |  | Corujas   |  | Cormorões       |  | Tartarugas   |
|  | Mamíferos marinhos |  | Patos     |  | Pelicanos       |  | Anuros       |
|  | Pinguins           |  | Gaiivotas |  | Martim-pescador |  | Peixes       |
|  | Aves predadoras    |  | Garças    |  | Cobras          |  | Sanguessugas |
|  |                    |  |           |  | Jacarés         |  | Caramujos    |

**Figura 1.** Árvore filogenética com base no critério de Inferência Bayesiana (IB) reconstruído a partir das sequências 28S rDNA de membros Diplostomoidea. Os valores das probabilidades posteriores ( $\geq 0,95$ ) são indicados nos nós. A identificação das sequências foi feita de acordo com o GenBank. As figuras à esquerda demonstram os tipos morfológicos das metacercárias. Legenda com figuras correspondentes aos hospedeiros abaixo.

Não inesperadamente, o padrão de agrupamento foi consistente com o morfotipo das metacercárias. Os representantes caracterizados por cistos espessos formados por multicamadas (do tipo ‘prohemistomulum’) foram recuperados divergindo anteriormente aos táxons que possuem metacercárias dos tipos ‘neascus’, ‘tetracotyle’ e ‘diplostomulum’. Os diplostomóides com metacercárias do tipo ‘neascus’ coletadas em peixes como hospedeiros agruparam-se em dois subclados intimamente relacionados, correspondendo aos representantes com cistos de multicamadas, espessos e pigmentados [= Crassiphialinae, clado 1 *sensu* ACHATZ et al. (2019a)], e membros que possuem metacercárias do tipo ‘neascus’ com cistos finos e transparentes [= Crassiphialinae clado 2 *sensu* ACHATZ et al. (2019a)]. A metacercária do tipo ‘prodiplostomulum’ previamente reconhecida pelos membros do *Bolbophorus* foi resolvida como basal para os membros com o cisto fino e transparente de metacercárias do tipo ‘neascus’. Espécies caracterizadas com metacercárias do tipo ‘tetracotyle’ agruparam em três clados correspondentes aos clados ‘Strigeini’ (com cistos multicamadas e grossos), clado ‘Cotylurini’ (com cistos transparentes e finos) e um clado composto por estrigeídeos e diplostomóides com posição não resolvida, ou seja, *Cotylurus* + *Ichthyocotylurus* + *Codonocephalus* + *Neodiplostomum* + *Hysteromorpha*. Os estrigeídeos estavam intimamente relacionados com os membros de Proterodiplostomidae, estes com cistos finos e transparentes. Diplostomidae (*s.s.*) é constituído por membros sem metacercárias encistadas que foram recuperados a parte como o mais recente táxon divergente entre os diplostomoídeos.

As relações intraespecíficas dentro de Proterodiplostomidae foram avaliadas em conjuntos de dados genéticos separados (Figuras 2A, B). A matriz 28S apresentou 1.960 pb de comprimento e a análise de BI referente a esta produziu uma árvore bem suportada (Figura 2A) com padrão de agrupamento congruente com o conjunto de dados para Diplostomoidea. As espécies representantes de *Proterodiplostomum* (Proterodiplostominae) formaram um clado monofilético fortemente apoiado. Dois grupos irmãos relacionados foram recuperados: (i) *Proterodiplostomum longum* + *Proterodiplostomum* sp. 3 e (ii) *Proterodiplostomum* sp. 1 + *Proterodiplostomum* sp. 2. Proterodiplostomidae gen. sp. 1 e *Prolecithodiplostomum constrictum* foram recuperados como divergentes anteriores aos Proterodiplostominae. Os dois isolados de metacercárias identificados provisoriamente como Proterodiplostomidae gen. sp. 2

e *Proterodiplostomum* gen. sp. 3 agruparam com *Crocodilicola pseudostoma* em um clado monofilético fortemente suportado. O *Heterodiplostomum lanceolatum* foi resolvido como o primeiro divergente entre os proterodiplostomídeos.



**Figura 2.** Árvores filogenéticas com base no critério de Inferência Bayesiana (IB) para espécies da família Proterodiplostomidae. **A.** Análise filogenética do gene 28S rDNA. **B** Análise filogenética do gene *cox1* mtDNA. Os valores das probabilidades posteriores ( $\geq 0,95$ ) são indicados nos nós. Siglas: B, brânquias; C, cavidade corporal; CE, cérebro; E, estômago; L, lentes dos olhos; I, intestino; V, vesícula biliar.

As comparações das sequências de 28S entre os isolados recém-sequenciados são fornecidas na Tabela 3. A divergência interespecífica variou de 0,1 a 5,7% (diferença de 1 a 68 pb). Não foi detectada divergência intraespecífica para nenhuma das espécies apresentadas, isto é, sequências idênticas foram compartilhadas entre: (i) o isolado adulto de *P. constrictum* coletado em *Paleosuchus trigonatus* e a metacercária isolada de *Cyphocarax leucostictus*; (ii)



os três isolados de metacercárias de *Proterodiplostomum* sp. 1 em *Trachylepterus galeatus* e *T. paraguayensis*; e (iii) os quatro isolados de metacercárias de *Proterodiplostomum* sp. 3 provindos de *Hemiodontichthys acipenserinus*, *Phalacrocorax brasilianus*, *Hemiodus unimaculatus* e *Hemiodonthichthys acipenserinus*. O único isolado de um *Proterodiplostomum longum* adulto diferiu em uma única posição de *Proterodiplostomum* sp. 3. *Crocodicicola pseudosoma* diferiu entre 9 e 12 pb dos proterodiplostomídeos mais próximos, *Proterodiplostomidae* gen. sp. 2 e *Proterodiplostomidae* gen. sp. 3, respectivamente. *Heterodiplostomum lanceolatum* diferiu em 52–68 pb dos demais proterodiplostomídeos.

As relações intraespecíficas entre os proterodiplostomídeos foram avaliadas ainda para o conjunto de dados do gene *cox1* (Figura 2B). As árvores resultantes para *Proterodiplostomidae* e *Diplostomoidea* apresentaram topologias semelhantes. *Prolecithodiplostomum constrictum* foi recuperado como o primeiro divergente entre os proterodiplostomídeos.

A divergência genética interespecífica entre os isolados recém-sequenciados variou entre 1,7 e 20,9% (diferença de 10–123 pb). A única sequência *cox1* publicada de um proterodiplostomídeo (MF398317, *Crocodicicola pseudostoma*), provinda do México, diferiu em 20,4–23,6% (121–140 pb) das novas espécies de sequências do Brasil. A divergência intraespecífica foi de 0,3–0,8% (2–5 pb) para *Proterodiplostomum* sp. 1; de 0,5% (3 pb) para *Proterodiplostomum* sp. 3 e 0,2% (1 pb) entre as duas sequências de *Prolecithodiplostomum constrictum*.

**Tabela 3.** Divergência genética média (distância p não corrigida em%) estimada para sequências *cox1* parciais intraespecíficas (diagonal, negrito) e interespecíficas para *Proterodiplostomidae* (abaixo da diagonal). As diferenças totais em pares de base entre as sequências 28S rDNA são fornecidas acima da diagonal.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>Proterodiplostomum longum</i>	–	4	3	1	37	64	66	35
2 <i>Proterodiplostomum</i> sp. 1	–	<b>0,3–0,8</b>	1	3	36	65	67	36
3 <i>Proterodiplostomum</i> sp. 2	–	1,7	–	2	34	63	65	34
4 <i>Proterodiplostomum</i> sp. 3	–	7,1–7,9	7,4–7,8	<b>0,5</b>	37	66	68	37
5 <i>Proterodiplostomidae</i> gen. sp. 1	–	15,3–16,2	15,5	15,5–15,7	–	64	66	46
6 <i>Proterodiplostomidae</i> gen. sp. 2	–	–	–	–	–	–	3	47
7 <i>Proterodiplostomidae</i> gen. sp. 3	–	–	–	–	–	–	–	50
8 <i>Prolecithodiplostomum constrictum</i>	–	19,6–19,9	19,7–19,9	19,9–20,1	20,8–20,9	–	–	<b>0.2</b>

### 3.3.3 Considerações sobre morfotipos de metacercárias

Os espécimes em estágio de metacercária examinados no presente estudo concordam bem com o conceito definido por Shoop (1989) de ‘proterodiplostomulum’ que aqui consideramos válido, apresentando as seguintes características: cisto fino e transparente de origem do parasito, pseudoventosas presentes ou ausentes, segmento anterior do corpo oval ou alongado sem concavidade ventral, sistema excretor com três canais longitudinais que compreende em um mediano e dois laterais com ramos posteriores e um sistema de ramificações com concreções excretórias ovais ou redondas livres. Em peixes. Adultos em répteis piscívoros.

Na análise filogenética para Diplostomoidea aqui apresentada dois principais clados para membros dos Strigeidae, consistentes com as tribos Strigeini e Cotylurini, são caracterizados com metacercárias do tipo ‘tetracotyle’. Com base nos dados da literatura e nos resultados filogenéticos obtidos, diferenças sutis podem ser reconhecidas entre as metacercárias destas duas tribos e são aqui demonstradas:

(i) “Tetracotyle Strigeini”: Encistado e encapsulado; cisto oval, com paredes grossas de origem parasito. Parede do cisto muito grossa composta por duas camadas; canais do cisto anterior e posterior presentes. Corpo grande, piriforme, com concavidade ventral no segmento anterior, segmento posterior pequeno, cônico. As pseudoventosas se apresentam abaixo da ventosa oral ou ao nível médio da ventosa ventral. Ventosa oral terminal, cercado por glândulas; faringe pequena, contígua a ventosa oral; esôfago muito curto; ceco de paredes finas, inflado, passando lateralmente para ventosa ventral e órgão tribocítico, estendendo-se próximo à extremidade posterior do corpo. Pseudoventosas grandes, glandulo-musculares, capazes de grande distensão, geralmente postero-lateral a ventosa oral. Ventosa ventral grande, muscular, protrusível, anterior ao órgão tribocítico ou sobreposto. Órgão tribocítico grande, muscular, bilobado, prolongável na concavidade do segmento anterior. Glândula proteolítica grande, alongada transversalmente do lobo posterior ao ventral do órgão tribocítico. Órgãos genitais primordiais pequenos, indiferenciados, posterior ao órgão tribocítico no segmento posterior. Sistema excretor de reserva bem desenvolvido, com grandes câmaras recobertas de corpúsculos excretores, vesícula excretora bi-cornata; poro excretor terminal. Em vertebrados.

(ii) “Tetracotyle Strigeini”: encistadas, cisto piriforme, parede muito grossa composta por duas camadas; canais do cisto anterior e posterior presentes. Corpo grande, piriforme, com segmento anterior sem concavidade distinta ou presente apenas como cavidade leve; segmento posterior pequeno, cônico. Pseudoventosas presentes ao nível da ventosa oral. Ventosa oral

subterminal, sem glândulas orais; faringe pequena, contígua com ventosa oral; esôfago muito curto; ceco de paredes finas, estreito, estendendo-se próximo à extremidade posterior do corpo. Pseudoventosas grandes, glandulo-musculares, capazes de grande distensão, geralmente postero-lateral à ventosa oral. ventosa ventral grande, muscular. Órgão tribocítico grande, muscular, bilobada. Glândula proteolítica grande, posterior ao órgão de tribocítico. Órgãos genitais primordiais pequenos, indiferenciado, posterior ao órgão tribocítico no segmento posterior do corpo. Reserva do sistema excretor bem desenvolvido, bexiga de reserva forma uma rede espessa, preenchendo todo o corpo com grandes câmaras cheias de corpúsculos excretórios livres de vários tamanhos; vesícula excretora no segmento posterior do corpo, bicornada; poro excretor terminal. Em vertebrados.

### **3.3.4 Descrição das espécies e sumário taxonômico**

Classe Trematoda Rudolphi, 1808

Subclasse Digenea Carus, 1863

Ordem Diplostomida Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003

Subordem Diplostomata Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003

Superfamília Diplostomoidea Poirier, 1886

Família Proterodiplostomidae Dubois, 1936

Subfamília Proterodiplostominae Dubois, 1936

Gênero *Proterodiplostomum* Dubois, 1936

#### **3.3.4.1 *Proterodiplostomum longum* (Brandes, 1888)**

*Descrição* (Figura 3)

*Adulto* [baseada em 2 espécimes fixados em formalina 4% aquecida, medidas na Tabela 4]:

Corpo distintamente bipartido. Segmento anterior espatulado com distinta concavidade ventral. Segmento posterior longo, cilíndrico, continuação direta do segmento anterior, mais largo na parte posterior, com estrutura muscular similar a uma ventosa na extremidade posterior. Ventosa oral pequena, oval, terminal. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral pequena, ligeiramente oval disposta na região anterior do segmento anterior. Pré-faringe indistinta. Faringe esférica, sobrepondo a margem posterior da ventosa oral. Esôfago muito curto. Ceco

longo, afilado, estende lateralmente ao órgão tribocítico e termina cego próximo a extremidade posterior do corpo. Órgão tribocítico elíptico, abertura longitudinal tipo fenda, abertura envolvida internamente por 20 papilas, elevado acima da superfície ventral, razoavelmente próximo a margem posterior do segmento anterior. Dois testículos, tandem, de igual tamanho, no segundo terço do segmento posterior. Vesícula seminal sinuosa pós-testicular. Glândula parapróstática bem desenvolvida, tubular, células glandulares externas delimitadas por uma membrana, dorsal ao ducto ejaculatório, fino ducto eferente se une ao ducto ejaculatório, se abre na extremidade do pequeno cone genital. Cone genital possui estrutura muscular tipo ventosa. Bolsa copulatória espaçosa, com grande abertura subterminal. Ovário pré-testicular, esférico, próximo ao testículo anterior. Canal de Laurer e oótipo não observados. Glândula de Mehlis grande, subdextral, intertesticular, ligeiramente sobrepondo o testículo anterior. Útero longo, torcido, sinuoso, com porções ascendentes e descendentes, passa anteriormente à glândula de Mehlis ao nível do primeiro quarto do segmento posterior, retorna e continua posteriormente, subdextral, ventral ao ducto ejaculatório, abre entre o cone genital cone e estrutura tipo ventosa. Ovos numerosos, grandes, não-filamentados. Vitelária folicular, folículos vitelínicos numerosos, densos, com formato irregular, distribuída em dois campos laterais estendendo do nível da margem anterior da ventosa ventral, envolvendo o órgão tribocítico, continuando no segmento posterior alcançando região pós testículo posterior, estendendo-se próximo à glândula parapróstática. Reservatório vitelínico intertesticular. Sistema excretor visto somente no segmento anterior como dois ramos laterais e um mediano que se unem ao nível da faringe

#### *Sumário taxonômico*

*Hospedeiro definitivo: Caiman latirostris* (Daudin) (Crocodylia: Alligatoridae).

*Sítio de infecção no hospedeiro: intestino (C. latirostris).*

*Localidade: rio Guandu, Rio de Janeiro (22°81'S, 43°62'W)*

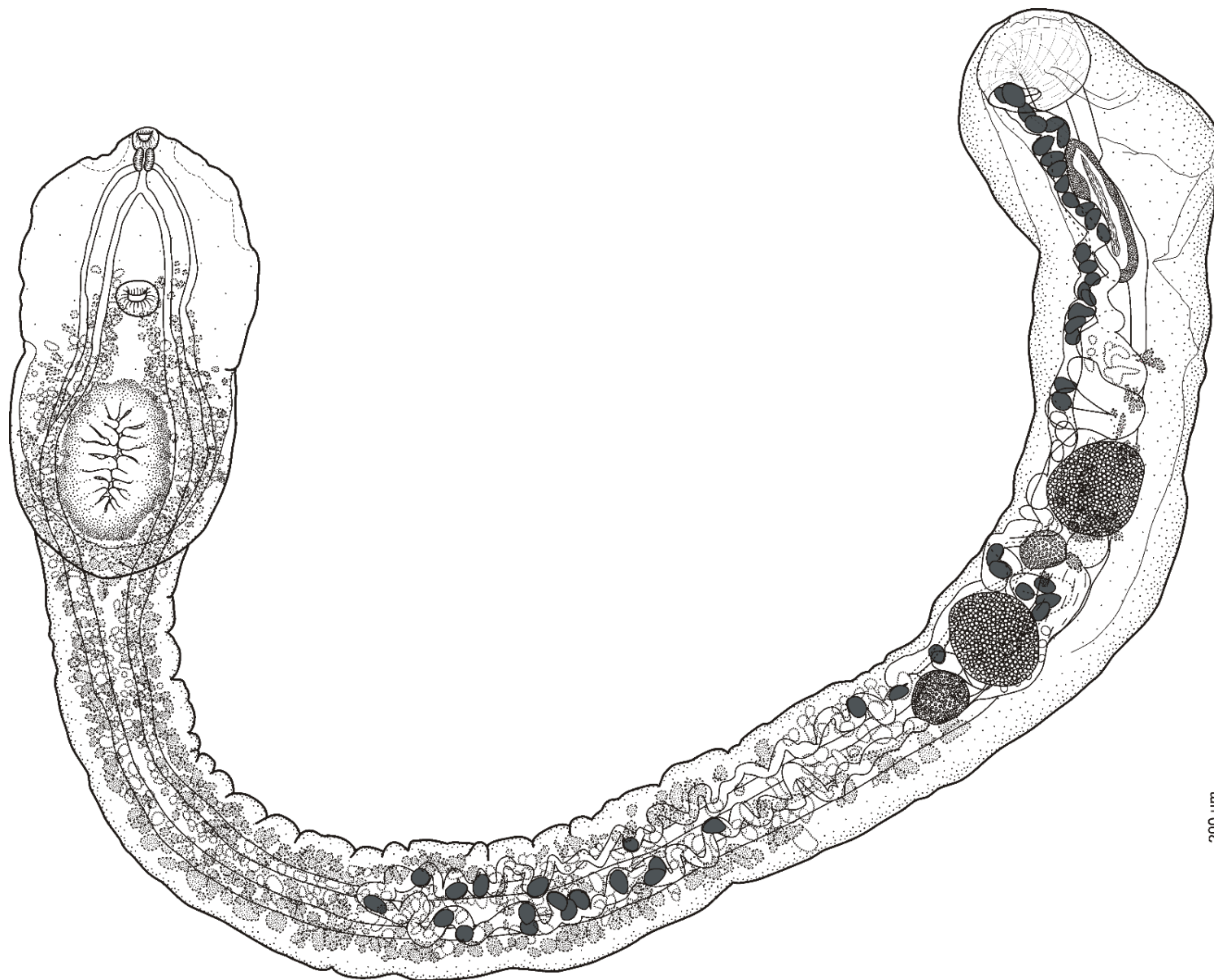
*Espécimes representativos: um hologenóforo e dois paragenóforos; uma fotomicrografia do paragenóforo é providenciada na figura suplementar S1.*

*Sequência de DNA: 28S rDNA: MT187589 (holótipo).*

## Comentários

Os presentes espécimes foram identificados como *P. longum* (Brandes, 1888) baseado no segmento posterior mais longo que o anterior, pré-faringe ausente ou indistinta, órgão tribocítico elíptico envolvido por 20–22 papilas, folículos vitelínicos estendendo da margem anterior da ventosa ventral, envolvendo o órgão tribocítico e continuando no segmento posterior ultrapassando o testículo posterior. Além da glândula paraprostática tubular envolvida por células glandulares e a presença de uma estrutura tipo ventosa no cone genital.

*Proterodiplostomum longum* difere de *P. tumidulum* e *P. ophidium* por possuir o segmento posterior mais alongado que o anterior (vs segmento anterior e posterior de tamanho aproximadamente igual), de *P. globulare* e *P. breve* pela glândula paraprostática tubular envolvida por células glandulares delimitadas por uma membrana (vs glândula paraprostática globular não envolvida por células glandulares no *P. globulare* e glândula curta, de formato de clava envolvida por células glandulares em *P. breve*); de *P. medusae* pelos folículos vitelínicos se estenderem do nível da margem anterior da ventosa ventral continuando no segmento posterior pós testículo posterior (vs folículos vitelínicos condensados entre a extremidade posterior do segmento anterior, estendendo ao segmento posterior próximo a extremidade posterior do corpo).



**Figura 3.** Adulto de *Proterodiplostomum longum* (Brandes, 1888) coletado em *Caiman latirostris* no rio Guandu, Rio de Janeiro. Paragenóforo. Vista ventral.

**Tabela 4.** Dados morfométricos comparativos para *Proterodiplostomum longum* (estágio adulto).

Espécie	<i>P. longum</i> (Brandes, 1888)	<i>P. longum</i>	<i>P. breve</i> Catto & Amato, 1994	<i>P. globulare</i> Catto & Amato, 1994	<i>P. tumidulum</i> Dubois, 1936	<i>P. medusae</i> (Dubois, 1936)
Hospedeiro	<i>Caiman latirostris</i> (Daudin, 1801)	<i>Crocodylus</i> sp.	<i>Caiman c. yacare</i> (Daudin, 1802)	<i>Caiman c. yacare</i> (Daudin, 1802)	<i>Caiman crocodilus</i>	<i>Caiman crocodilus</i>
Referência	Presente estudo	Dubois (1938)	Catto & Amato, 1994	Catto & Amato, 1994	Dubois, 1936	Dubois, 1936
Tamanho amostral	<i>n</i> = 2	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 20
CT	9,503–9,571	3,750–9,300	2,690–4,220	2,560–4,750	1,800–2,500	1,680–2,340
LT	969–986	360–690	470–1,180	550–1,240	370–540	390–600
CVO	85	53–95	102–146	51–73	62–86	34–50
LVO	102–119	55–96	109–175	43–73	62–85	53–70
CF	77–85	53–89	73–116	51–73	74–86	48–60
LF	85	60–86	80–167	36–73	62–82	42–54
CVV	162–170	100–160	109–164	73–109	62–77	62–71
LVV	179–187	96–144	109–164	80–124	65–89	68–82
COT	629–680	170–270	366–658	201–457	250–330	170–270
LOT	408–459	280–540	192–549	183–495	170–230	140–290
COV	204–238	115–220	91–164	91–220	54–70	72–80
LOV	221–238	115–220	91–219	91–201	60–80	80
CTA	374–425	210–360	164–439	183–402	96–160	115–135
LTA	340–408	190–335	146–512	164–439	100–140	115–145
CTP	357–391	210–390	146–494	109–402	100–170	130–170
LTP	340–374	235–360	128–347	183–439	110–150	130–150
CSA	1,836–1,955	1,200–2,000	1,460–1,970	1,100–1,830	850–1,250	900–1290
CSP	7,548–7,820	2,340–7,500	970–2,380	1,280–2,920	780–1,260	720–1320
DVV-OT	289–391	180–540	nd	nd	45–150	135–200
POST	1,258–1,938	nd	nd	nd	nd	nd
POST/CT (%)	13–20	nd	nd	nd	nd	nd
AntOT/CSA (%)	57–63	62–73	55–73	52–70	60–65	58–68
VIT/ CSP (%)	81–86	73–91	nd	nd	nd	nd
VIT/ CSA (%)	69–70	38–46	nd	nd	30–46	52–62
DOV-TA	9–51	nd	nd	nd	nd	nd
CO	86–105	77–96	80–102	98–131	86–96	96–115
LO	57–89	48–65	44–65	44–66	55–64	57–65

*Abreviações:* nd, não disponível; CT, comprimento total do corpo; LT, largura total do corpo; CVO, comprimento da ventosa oral; LVO, largura da ventosa oral; CF, comprimento da faringe; LF, largura da faringe; CVV, comprimento da ventosa ventral; LVV, largura da ventosa ventral; COT,

comprimento do órgão tribocítico; LOT, largura do órgão tribocítico; COV, comprimento do ovário; LOV, largura do ovário; CTA, comprimento do testículo anterior; LTA, largura do testículo anterior; CTP, comprimento do testículo posterior; LTP, largura do testículo posterior; CSA, comprimento do segmento anterior; CSP, comprimento do segmento posterior; DVV-OT, distância entre a ventosa ventral e o órgão tribocítico; POST, comprimento da região pós-testicular; AntOT, região anterior ao órgão tribocítico; VIT, vitelária; DOV-TA, distância entre o ovário e o testículo anterior; CO, comprimento do ovo; LO, largura do ovo.



### 3.3.4.2 *Proterodiplostomum* sp. 1

*Descrição* (Figura 4)

*Metacercária* [baseada em espécimes coletados em *Trachelyopterus galeatus*, localidade: rio Paraná, Porto Rico, Paraná; três espécimes fixados em água quente, medidas na Tabela 5]. Metacercárias encistadas nas vísceras. Cistos ovais, paredes finas. Corpo muito alongado, achatado, mais largo na região anterior afinando posteriormente. Ventosa oral pequena, oval, muscular, terminal. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral subesférica, mais larga que ventosa oral, situado na região pós-equatorial. Pré-faringe aparentemente ausente. Faringe subesférica. Esôfago longo e afilado. Ceco longo, afilado, parede espessa, terminando cego posteriormente ao órgão tribocítico ao nível dos órgãos genitais primordiais. Órgão tribocítico alongado-oval, abertura longitudinal tipo fenda envolvida internamente por 14 papilas, intercecal, localizado na região posterior do corpo. Dois testículos primordiais, em posição tandem não bem definidos. Ovário primordial oval, pós-testicular, não bem definido, adjacente aos testículos. Poro genital terminal. Sistema excretor tipo '*diplostomulum*', formado por 2 canais laterais ramificados extracecais, um em cada lado formando uma rede no segmento anterior. Concreções excretoras livres, grandes, alongadas ou com formato irregular, muito denso na metade anterior do corpo, distribuídas predominantemente na região dorsal, estendendo posterior à ventosa ventral alcançando o órgão tribocítico lateralmente. Vesícula excretora em formato de V. Poro excretor terminal.

*Sumário taxonômico*

*Segundo hospedeiro intermediário: Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus) (Siluriformes: Auchenipteridae), *Trachydoras paraguayensis* (Eigenmann & Ward) (Siluriformes: Doradidae).

*Sítio de infecção no hospedeiro: vesícula biliar (T. paraguayensis); cavidade corporal (T. galeatus e T. paraguayensis).*

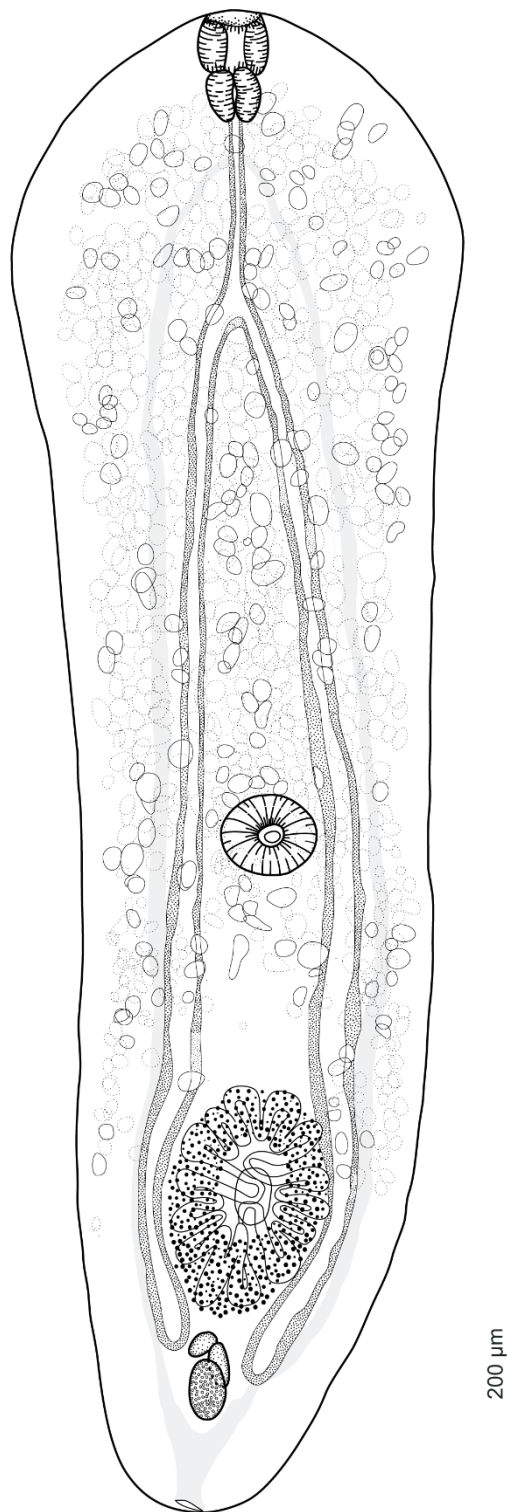
*Localidade: rio tributário do rio Paraná, Porto Rico, Paraná (22°76'S, 53°25'W).*

*Espécimes representativos: Três paragenóforos de metacercárias.*

*Sequências de DNA: 28S: MT187590; cox1: MT185361.*

## Comentários

A metacercária de *Proterodiplostomum* sp. 1 é distinguida morfológicamente da metacercária de outros proterodiplostomídeos pelo não desenvolvimento do segmento posterior e corpo mais largo na região anterior afinando posteriormente. Essa característica contrasta com outros proterodiplostomídeos em que o corpo é distintamente bipartido [*Heterodiplostomum lanceolatum* (MAÑÉ-GARZON & ALONSO, 1979; QUEIROZ et al., 2019)] ou lanceolado [Proterodiplostomatidae gen. sp. 1 (SCHOLZ et al., 1995) e *C. pseudostoma* (FERRARI-HOEINGHAUS et al., 2007)]. A distinção mais conspícua para *Proterodiplostomum* sp. 1 em relação as espécies aqui descritas é o corpo muito alongado, apesar do corpo alongado ter sido observado em três outras espécies identificadas provisoriamente como *Proterodiplostomum* sp. 2, *Proterodiplostomum* sp. 3 e Proterodiplostomidae gen. sp. 1, enquanto que Proterodiplostomidae gen. sp. 2 apresenta corpo mais largo e Proterodiplostomidae gen. sp. 3 corpo oval. O estágio de metacercária de *Proterodiplostomum* sp. 1 difere de todas espécies ainda por concreções excretoras grandes e com distribuição muito densa concentrada na região dorsal, além do órgão tribocítico com abertura envolvida internamente por 14 papilas. Estas características não foram reportadas em estudos prévios para qualquer outro proterodiplostomídeo.



**Figura 4.** Metacercária de *Proterodiplostomum* sp. 1 coletado na cavidade corporal de *Trachelyopterus galeatus* (Linnaeus) no rio Paraná. Paragenóforo. Vista Ventral

**Tabela 5.** Dados morfométricos comparativos para metacercárias de proterodiplostomídeos.

<b>Espécie</b>	<b><i>Proterodiplostomum</i> sp. 1</b>	<b><i>Proterodiplostomum</i> sp. 2</b>	<b><i>Proterodiplostomum</i> sp. 3</b>	<b>Proterodiplostomidae gen. sp. 1</b>
<b>Hospedeiro</b>	<i>Trachelyopterus galeatus</i> (Linnaeus) <i>Trachydoras paraguayensis</i> (Eigenmann & Ward)	<i>Pimelodus fur</i> (Linnaeus)	<i>Hemiodontichthys acipenserinus</i> (Kner) <i>Hemiodus unimaculatus</i> (Bloch) <i>Phalacrocorax brasilianus</i> (Gmelin)	<i>Cichla monoculus</i> Agassiz
<b>Localidade</b>	Rio Paraná, Paraná, Brasil	Rio Miranda, Mato Grosso do Sul, Brasil	Rio Jari, Amapá, Brasil	Rio Jari, Amapá, Brasil
<b>Referência</b>	Presente estudo	Presente estudo	Presente estudo	Presente estudo
<b>Tamanho amostral</b>	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 1
CT	932–1.304	1.152	514–742	425
CSA	–	–	–	–
LSA	276–376	393	169–348	175
CSP	–	–	–	–
LSP	–	–	–	–
CVO	38–59	45	33–41	41
LVO	46–55	54	30–43	33
CVV	51–66	63	27–58	21
LVV	59–80	71	35–43	32
CPF	ausente	ausente	5	ausente
CF	33–48	44	28–33	22
LF	34–39	42	19–27	21
OL	67–114	98	56–87	45
OW	7–17	20	7–14	7
COT	141–154	146	61–70	50
LOT	98–135	108	45–77	50
COTG	140–168	162	61–99	59
LOTG	94–144	135	56–89	54
COV	38–53	44	18–29	19
LOV	20–38	36	19–22	16
CTA	19–23	27	12–21	14
LTA	12–22	24	8–15	14
CTP	23–31	29	12–22	13
LTP	11–25	23	8–17	13
DVVAC	487–648	557	278–398	247
DVVPSA	219–471	536	181–330	152
DOTVV	129–211	165	69–113	21

**Tabela 5.** (continuação)

<b>Espécie</b>	<b>Proterodiplostomidae gen. sp. 2</b>	<b>Proterodiplostomidae gen. sp. 3</b>	<b><i>Prolecithodiplostomum</i> sp.</b>	<b>Proterodiplostomidae gen. sp. 1</b>
<b>Hospedeiro</b>	<i>Cichla monoculus</i> Agassiz	<i>Hemiodontichthys acipenserinus</i> (Kner) <i>Tatia</i> sp.	<i>Cyphocarax leucostictus</i> (Eigenmann & Eigenmann)	<i>Rhamdia guatemalensis</i> (Günther)
<b>Localidade</b>	Rio Jari, Amapá, Brasil	Rio Jari, Amapá, Brasil	Rio Jari, Amapá, Brasil	Yucatan, México
<b>Referência</b>	Presente estudo	Presente estudo	Presente estudo	Scholz et al. (1995)
<b>Tamanho amostral</b>	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 2	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 6
CT	798	1.043–1.271	677	2.270–2.620
CSA	–	–	–	–
LSA	492	627–669	257	660–790
CSP	–	–	–	–
LSP	–	–	–	–
CVO	41	63–64	42	65–68
LVO	56	55–73	39	68–88
CVV	76	147	47	157–195
LVV	117	113–144	62	198–224
CPF	ausente	ausente	ausente	ausente
CF	56	55–80	23	57–68
LF	48	32–4 5	20	30–45
OL	43	155–174	74	–
OW	19	–	–	–
COT	102	86–94	38	160–230
LOT	67	70–74	31	186–262
COTG	135	133–137	47	–
LOTG	107	131–138	41	–
COV	31	47	27	–
LOV	23	51	22	–
CTA	20	41	16	–
LTA	12	76	19	–
CTP	18	35	15	–
LTP	16	45	18	–
DVVAC	385	747	366	–
DVVPSA	355	418	277	–
DOTVV	68	125	60	–

**Tabela 5.** (continuação)

<b>Espécie</b>	<b>Proterodiplostomidae gen. sp. 2</b>	<b><i>Crocodilicola pseudostoma</i> (Willemoes-Suhm)</b>	<b><i>Heterodiplostomum lanceolatum</i> Dubois</b>	<b><i>Heterodiplostomum lanceolatum</i> Dubois</b>
<b>Hospedeiro</b>	<i>Astyanax fasciatus</i> (Cuvier); <i>Rocio octofasciatum</i> (Regan)	<i>Loricariichthys platymetopon</i> Isbrücker & Nijssen	<i>Leptodactylus podicipinus</i> (Cope)	<i>Leptodactylus latrans</i> (Steffen)
<b>Localidade</b>	Yucatan, México	Rio Paraná, Paraná, Brasil	Mato Grosso do Sul, Brasil	Rocha, Uruguai
<b>Referência</b>	Scholz et al. (1995)	Ferrari-Hoeinghaus et al. (2007)	Queiroz et al. (2019)	Mañé-Garzón & Alonso (1979)
<b>Tamanho amostral</b>	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 16	<i>n</i> = 9
CT	816–1.256	2.075–2.575	1.486–4.050 (1.241–6.036)	5.810–7.100
CSA	–	–	969–2.243 (711–3.225)	3.010–3.950
LSA	205–298	500–800	208–678 (248–879)	760–1.460
CSP	–	–	785–1.807 (532–2.811)	2.730–3.950
LSP	–	–	179–639 (211–715)	600–1.160
CVO	27–44	60–70	9–32 (23–45)	40–70
LVO	28–36	50–70	9–41 (27–51)	–
CVV	37–57	110–150	31–84 (20–148)	130–180
LVV	40–55	110–190	36–115 (35–173)	160–260
CPF	ausente	–	ausente	–
CF	17–28	50–70	6–46 (37–51)	60–110
LF	14–22	50–60	5–40 (27–46)	–
CE	–	–	–	80–170
LE	–	–	–	–
COT	67–160	170–260	328–773 (198–1.211)	1.010–1.240
LOT	65–109	150–230	38–130 (91–192)	370–420
COTG	–	–	–	–
LOTG	–	–	–	–
COV	–	70–120	29–75 (42–119)	100–130
LOV	–	60–110	29–100 (51–146)	100–130
CTA	–	70–100	65–130 (62–211)	160–220
LTA	–	160–180	72–182 (83–281)	140–230
CTP	–	50–90	66–147 (51–228)	180–240
LTP	–	110–200	84–220 (71–315)	160–270
DVVAC	–	–	–	1.310–1.750
DVVPSA	–	–	–	–
DOTVV	–	–	–	370–490

*Abreviações:* CT, comprimento total do corpo; CSA, comprimento do segmento anterior; LSA, largura do segmento anterior; CSP, comprimento do segmento posterior; LSP, largura do segmento posterior; CVO, comprimento da ventosa oral; LVO, largura da ventosa oral; CVV, comprimento da ventosa ventral; LVV, largura da ventosa ventral; CPF, comprimento da pré-faringe; CF, comprimento da faringe; LF, largura da faringe; CE, comprimento do esôfago; LE, largura do esôfago; COT, comprimento do órgão tribocítico; LOT, largura do órgão tribocítico; COTG, comprimento do órgão tribocítico glandular; LOTG, largura do órgão tribocítico glandular; COV, comprimento do ovário; LOV, largura

do ovário; CTA, comprimento do testículo anterior; LTA, largura do testículo anterior; CTP, comprimento do testículo posterior; LTP, largura do testículo posterior; DVVAC, distância entre ventosa ventral à extremidade anterior do corpo; DVVPSA, distância entre ventosa ventral à margem posterior do segmento anterior; DOTVV, distância entre o órgão tribocítico à ventosa ventral.

### 3.3.4.3 *Proterodiplostomum* sp. 2

*Descrição* (Figura 5)

*Metacercária* [baseada no espécime coletado em *Pimelodus fur*, Localidade: rio Miranda, Aquidauana, Mato Grosso do Sul; um espécime fixado em água quente, medidas na Tabela 5]. *Metacercária* livre na lentes dos olhos. Corpo alongado, achatado, mais largo na região anterior afinando posteriormente, segmento posterior ausente. Ventosa oral pequena, oval, muscular, terminal. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral subsférica, mais larga que ventosa oral, situado na região equatorial do corpo. Pré-faringe aparentemente ausente. Faringe subsférica, muscular. Esôfago longo, afilado, parede espessa. Ceco longo, afilado, parede espessa, terminando com fundo cego posterior ao órgão tribocítico ao nível dos órgãos genitais primordiais. Órgão tribocítico alongado-oval, abertura central pequena envolvida internamente por 10 papilas, intercecal, localizado na região posterior do corpo. Dois testículos primordiais, tandem, não bem definidos. Ovário primordial oval, pós-testicular, não bem definido, adjacente aos testículos. Poro genital terminal. Sistema excretor do tipo '*diplostomulum*', formado por 2 canais laterais ramificados extracecais, um em cada lado formando uma rede no segmento anterior. Concreções excretoras livres, pequenas, redondas, formato irregular, muito densa na metade anterior do corpo e intercecal posterior à ventosa ventral. Vesícula excretora em forma de V, com ramos anteriores alcançando a região mediana do esôfago. Poro excretor terminal.

*Sumário taxonômico*

*Segundo hospedeiro intermediário: Pimelodus fur* (Lütken) (Siluriformes: Pimelodidae)

*Sítio de infecção no hospedeiro:* lentes dos olhos.

*Localidades:* rio Miranda, Aquidauana, Mato Grosso do Sul (19°34'S 56°09'W).

*Espécimes representativos:* Voucher eletrônico do hologenóforo é providenciado na figura suplementar S1.

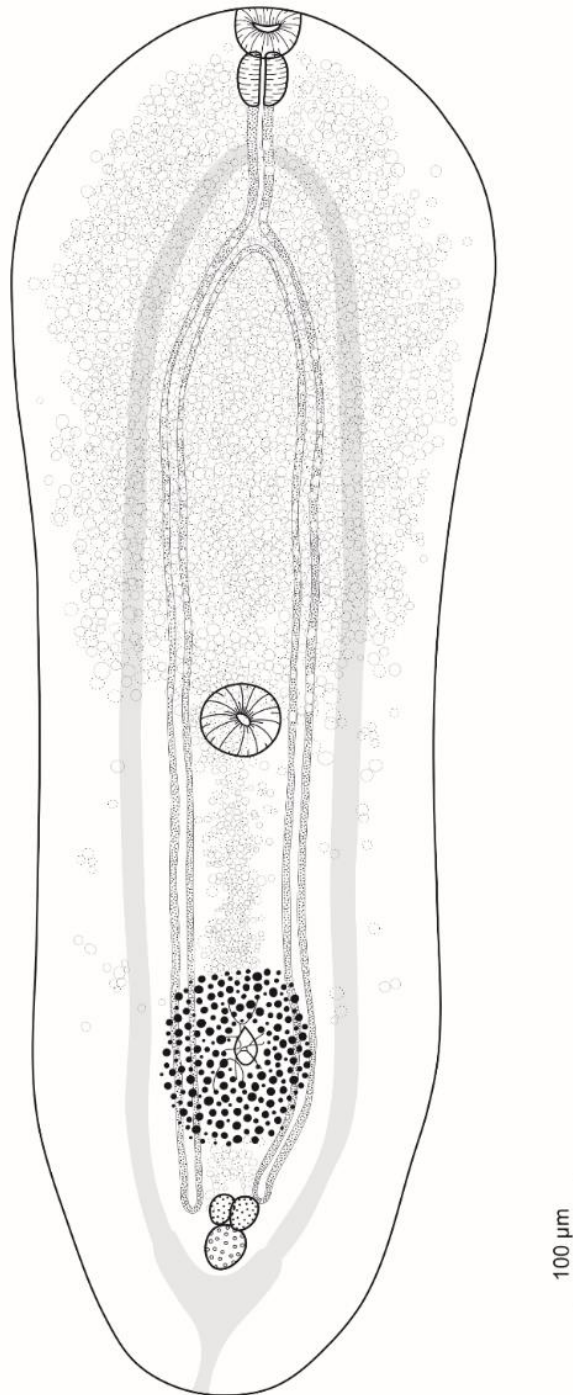
*Sequências de DNA:* 28S: MT187593; *cox1*: MT185364

*Comentários*

A presente espécie se assemelha a *Proterodiplostomum* sp. 1 pelo corpo alongado, mas difere deste por concreções excretoras relativamente pequenas e sua disposição, região anterior



do corpo mais largo (média da largura do corpo em relação ao comprimento do corpo 1:2,9 para *Proterodiplostomum* sp. 2 e 1:3,4 para *Proterodiplostomum* sp. 1) e maior distância entre a ventosa ventral e a margem posterior do corpo (536  $\mu\text{m}$  vs 219–471  $\mu\text{m}$  em *Proterodiplostomum* sp. 1).



**Figura 5.** Metacercária de *Proterodiplostomum* sp. 2 coletado na lente dos olhos de *Pimelodus fur* (Lütken) no rio Miranda, Mato Grosso do Sul. Hologenóforo. Vista Ventral.

### 3.3.4.4 *Proterodiplostomum* sp. 3

*Descrição* (Figura 6)

*Metacercária* [baseada em espécimes coletados em *Hemiodontichthys acipenserinus*, localidade: rio Jari, Amapá; quatro espécimes fixados em etanol absoluto, medidas na Tabela 5]. Metacercárias encistadas na cavidade cranial. Cistos ovais, paredes finas. Corpo alongado, achatado, mais largo na região anterior afinando posteriormente. Ventosa oral pequena, subsférica muscular, terminal. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral subsférica, maior que a ventosa oral, situada posterior a região equatorial corpo. Pré-faringe pequena. Faringe alongada. Esôfago longo, afilado. Ceco longo, afilado, termina cego posterior ao órgão tribocítico ao nível dos órgãos genitais primordiais. Órgão tribocítico subsférico, elevada acima da superfície ventral, abertura central pequena, intercecal, situado na região posterior do corpo. Dois testículos primordiais, tandem, não bem definidos. Ovário primordial oval, pós-testicular, adjacente aos testículos. Poro genital terminal. Sistema excretor do tipo ‘diplostomulum’, formado por dois canais laterais ramificados extracecais, um de cada lado formando uma rede no segmento anterior. Concreções excretoras livres, muito grande, redondas, muito densa, distribuídas predominantemente na região dorsal na metade anterior do corpo, não alcança as bordas do corpo, posterior à ventosa ventral na região intercecal alcançando o ovário. Vesícula excretora em formato de V. Poro excretor terminal.

*Sumário taxonômico*

*Hospedeiro intermediário: Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin) (Suliformes: Phalacrocoracidae).

*Segundo hospedeiro intermediário: Hemiodontichthys acipenserinus* (Kner) (Siluriformes: Loricariidae), *Hemiodus unimaculatus* (Bloch) (Characiformes: Hemiodontidae).

*Sítio de infecção: estômago (P. brasilianus); cérebro e brânquias (H. acipenserinus); intestino (H. unimaculatus).*

*Localidades: rio Jari, Amapá (1°07'31.6"S, 51°59'38.8"W).*

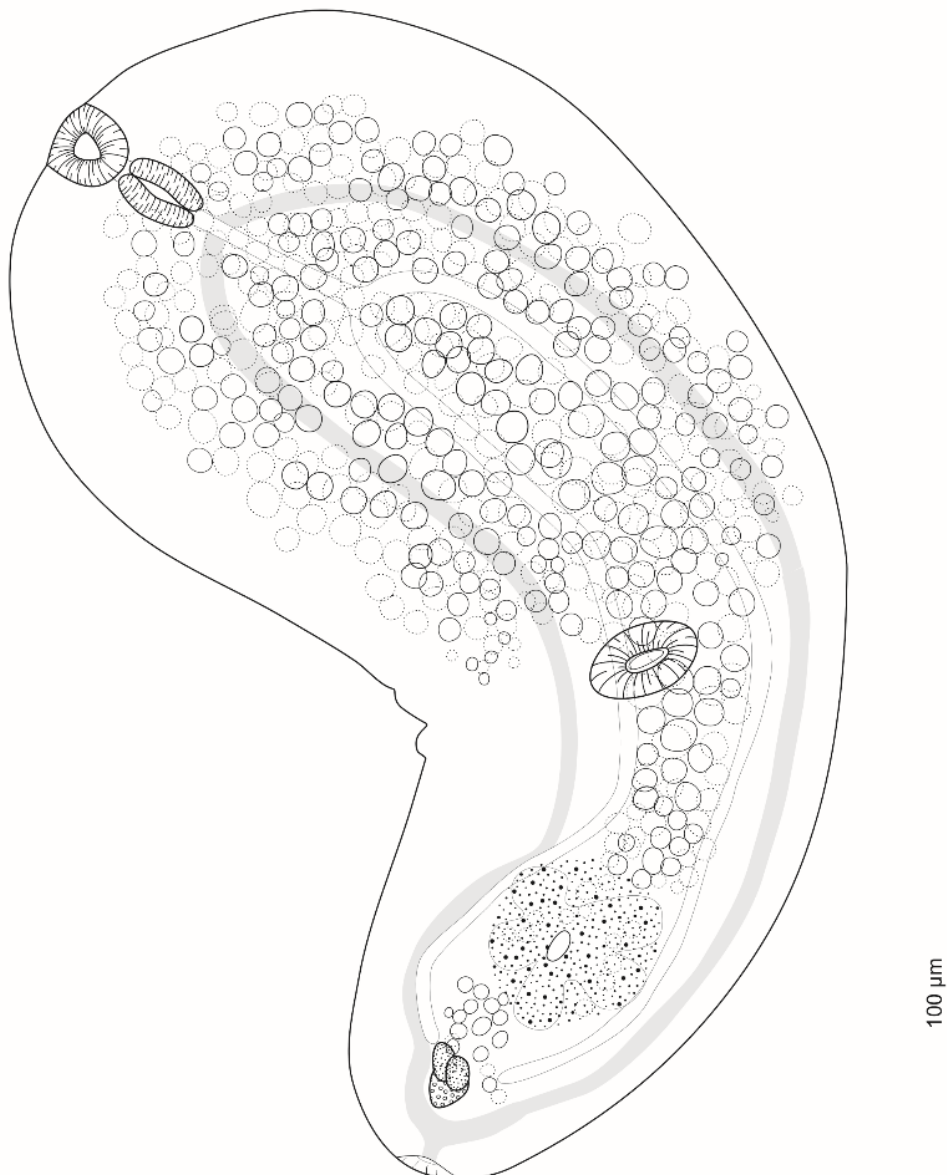
*Espécimes representativos: Voucher eletrônico do hologenóforo providenciado na figura suplementar S2.*

*Sequências de DNA: 28S: MT187594–7; cox1: MT185365–6.*

## Comentários

*Proterodiplostomum* sp. 3 se assemelha tanto a *Proterodiplostomum* sp. 1 quanto a *Proterodiplostomum* sp. 2 por corpo mais largo na parte anterior e afilado posteriormente, mas difere de ambos por faringe alongada (vs subsférica), órgão tribocítico subsférico (vs alongado-oval) e concreções excretoras muito grande (vs grande em *Proterodiplostomum* sp. 1, pequena em *Proterodiplostomum* sp. 1 e 2) distribuído predominantemente na região dorsal, corpo nitidamente curto (vs alongado).

O status de espécie distinta de todas quatro do gênero *Proterodiplostomum* coletadas no presente estudo é ainda confirmado pelos dados das sequências e divergência genética para o gene *cox1* variando de 1,7 a 7,9%.



**Figura 6.** Metacercária de *Proterodiplostomum* sp. 3 coletado na cavidade cranial de *Hemiodontichthys acipenserinus* (Kner) no rio Jari, Amapá. Hologenóforo. Vista Ventral.

### 3.3.4.5 Proterodiplostomidae gen. sp. 1

#### *Descrição* (Figura 7)

*Metacercária* [baseada em espécimes coletados em *Cichla monoculus*, localidade: rio Jari, Amapá; um espécime fixado em etanol absoluto, medidas na Tabela 5]. Metacercária no intestino. Corpo alongado, achatado, mais largo na região anterior e afilado posteriormente. Ventosa oral oval, muscular, terminal. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral subesférica, situado em região pós-equatorial do corpo. Pré-faringe curta. Faringe, subesférica. Esôfago longo. Ceco longo, afilado, termina cego posterior ao órgão tribocítico ao nível dos órgãos genitais primordiais. Órgão tribocítico subesférico, pequena abertura, intercecal, na região posterior do corpo. Dois testículos primordiais, tandem, não bem definidos. Ovário primordial oval, pós-testicular, não bem definido, adjacente aos testículos. Sistema excretor do tipo ‘*diplostomulum*’, formado por 2 canais laterais ramificados extracecais, um de cada lado formando uma rede no segmento anterior. Concreções excretoras livres, grandes, redondas ou de formato irregular próximo as bordas do corpo, denso na metade anterior do corpo, estende desde a ventosa oral aos órgãos genitais primordiais ao nível de vesícula excretora. Vesícula excretora em formato de V. Poro excretor terminal.

#### *Sumário taxonômico*

*Segundo hospedeiro intermediário:* *Cichla monoculus* Agassiz (Cichliformes: Cichlidae).

*Sítio de infecção no hospedeiro:* intestino.

*Localidades:* rio Jari, Amapá (1°07'31.6"S, 51°59'38.8"W).

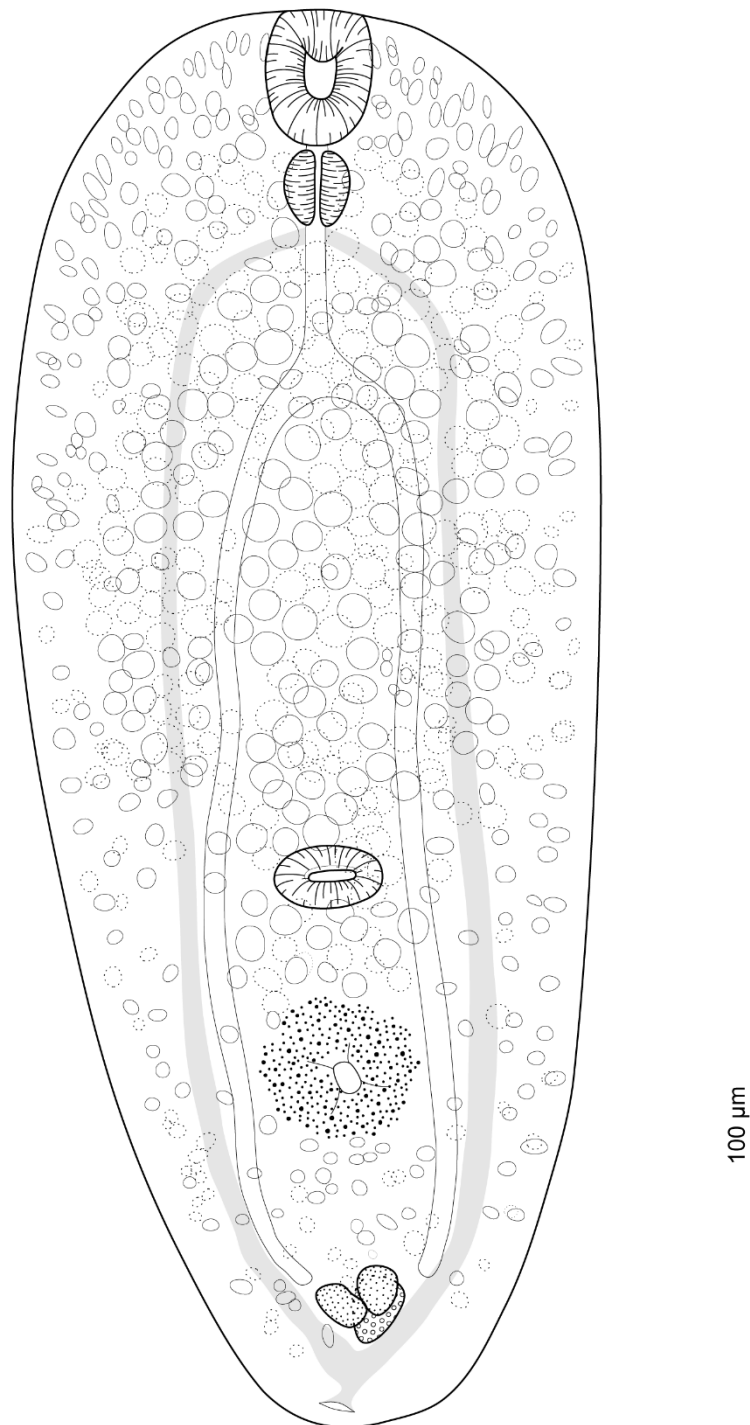
*Espécimes representativos:* Voucher eletrônico do hologenóforo providenciado na figura suplementar S2.

*Sequências de DNA:* 28S: MT187598; *cox1*: MT185367.

#### *Comentários*

A presente espécie difere de todas outras descritas acima por apresentar a menor distância entre o órgão tribocítico e a ventosa ventral representados pela proporção distância entre o órgão tribocítico e a ventosa ventral: comprimento total do corpo (1:20 em Proterodiplostomidae gen. sp. 1 vs 1:6,4 em *Proterodiplostomum* sp. 1; 1:7 em

*Proterodiplostomum* sp. 2; 1:7 em *Proterodiplostomum* sp. 3; 1:11,7 em *Proterodiplostomidae* gen. sp. 2 e 1:10 em *Proterodiplostomidae* gen. sp. 3), concreções excretoras bem distribuídas pelo corpo alcançando as extremidades anterior e laterais, além de ultrapassarem os órgão genitais (vs concreções excretoras que não alcançam as laterais e não ultrapassam os órgãos genitais).



**Figura 7.** Metacercária de *Proterodiplostomidae* gen. sp. 1 coletado no intestino de *Cichla monoculus* Agassiz no rio Jari, Amapá. Hologenóforo. Vista Ventral

### 3.3.4.6 Proterodiplostomidae gen. sp. 2

#### *Descrição* (Figura 8)

*Metacercária* [baseada em um espécime coletado em *Cichla monoculus*, localidade: rio Jari, Amapá; um espécime fixado em etanol absoluto, medidas na Tabela 5]. Metacercária encistada na cavidade cranial. Cistos ovais, paredes finas. Corpo achatado, mais largo na região anterior e afinando posteriormente. Ventosa oral pequena, oval muscular, terminal. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral oval, maior que ventosa oral, situado na região equatorial do corpo. Pré-faringe indistinta. Faringe subsférica. Esôfago curto. Ceco longo, afilado, terminando cego posterior ao ovário primordial. Órgão tribocítico alongado-oval, abertura longitudinal em forma de fenda com 12 papilas, intercecal, localizado na região posterior do corpo. Dois testículos primordiais, tandem. Ovário primordial oval, pós-testicular. Sistema excretor do tipo ‘*diplostomulum*’, formado por 2 canais laterais ramificados extracecais, um de cada lado formando uma rede no segmento anterior. Concreções excretoras livres, pequenas, redondas ou com formato irregular, muito denso na metade anterior do corpo, posterior à ventosa ventral se distribui na região intercecal não alcançando o órgão tribocítico. Vesícula excretora em formato de V. Poro excretor terminal.

#### *Sumário taxonômico*

*Segundo hospedeiro intermediário: Cichla monoculus* Agassiz (Cichliformes: Cichlidae).

*Sítio de infecção no hospedeiro: cavidade cranial.*

*Localidades: rio Jari, Amapá (1°07'31.6"S, 51°59'38.8"W).*

*Espécimes representativos: voucher eletrônico do hologenóforo providenciado na figura suplementar S2.*

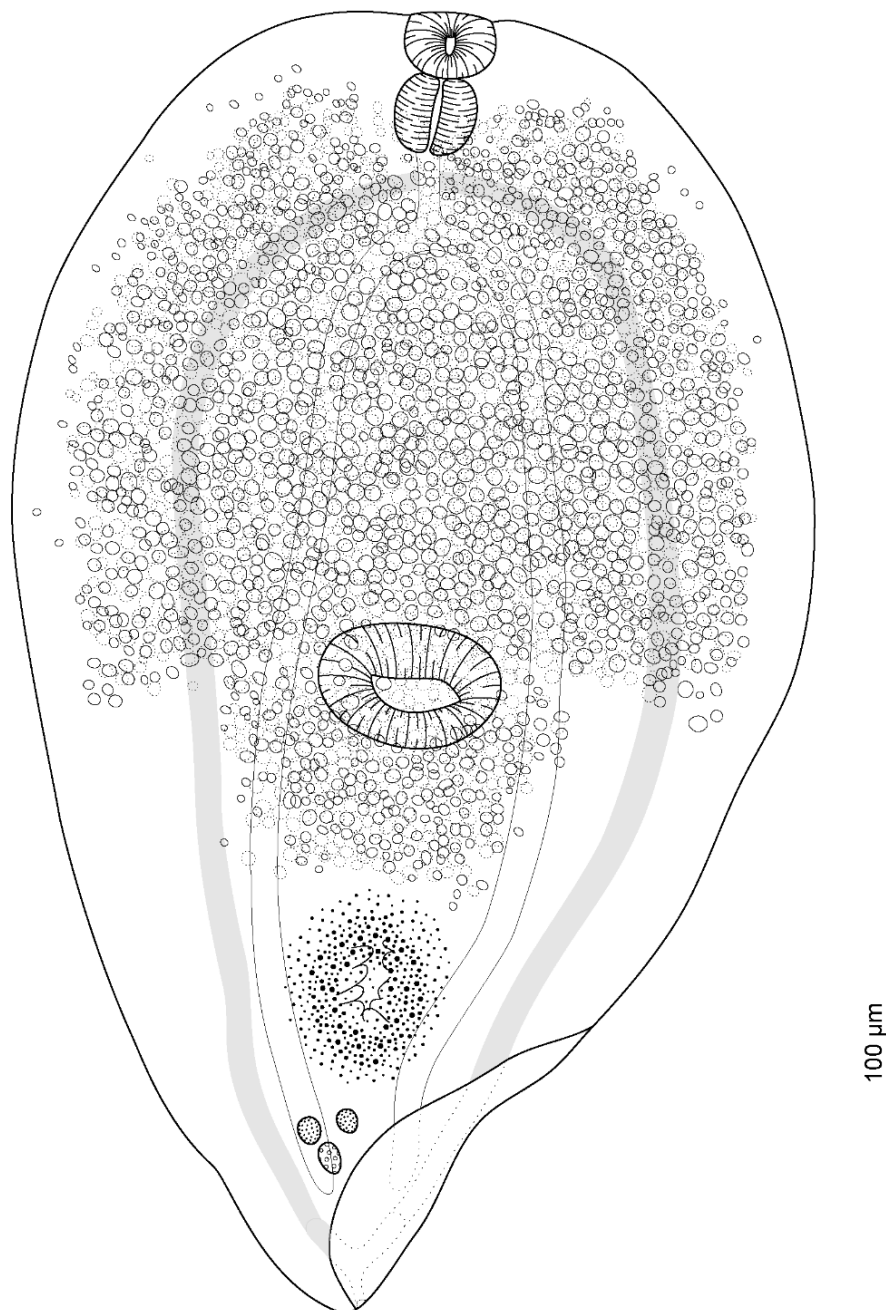
*Sequência de DNA: 28S: MT187599, cox1: MT185364.*

#### *Comentários*

A metacercária de Proterodiplostomidae gen. sp. 2 se assemelha a Proterodiplostomidae gen. sp. 1, também coletada em um ciclídeo, pelo corpo mais largo próximo a região equatorial afinando posteriormente, entretanto em Proterodiplostomidae gen. sp. 1 há uma menor diferença entre largura na região anterior e equatorial. A presente espécie difere das demais pelo corpo não alongado, apresentando maior largura do corpo em razão do comprimento (1:1,6 vs 1:3,4

em *Proterodiplostomum* sp. 1; de 1:2,9 em *Proterodiplostomum* sp. 2; de 1:2,3 em *Proterodiplostomum* sp. 3; de 1:2,4 em *Proterodiplostomidae* gen. sp. 1 e 1:1,7 em *Proterodiplostomidae* gen. sp. 3), ventosa ventral grande duas vezes maior que ventosa oral e a distribuição das concreções excretoras principalmente na metade anterior do corpo não alcançando o órgão tribocítico, além do tamanho destas na qual aparece muito menor que em outros representantes.

A comparação da sequência de *Proterodiplostomidae* gen. sp. 2 com todas outros representantes da família revelam uma distância genética entre 3,7–5,6% em sequências de 28S rDNA.



**Figura 8.** Metacercária de *Proterodiplostomidae* gen. sp. 2 coletado na cavidade cranial de *Cichla monoculus* Agassiz no rio Jari, Amapá. Hologenóforo. Vista Ventral.

### 3.3.4.7 Proterodiplostomidae gen. sp. 3

*Descrição* (Figura 9)

*Metacercária* [baseada em espécimes coletados em *Hemiodontichthys acipenserinus*, localidade: rio Jari, Amapá; dois espécimes fixados em etanol absoluto, medidas na Tabela 5]. Metacercárias encistado nas vísceras. Cistos ovais, paredes finas. Corpo oval, achatado. Ventosa oral pequena, subsférica muscular, terminal. Pseudoventosas presente. Ventosa ventral oval, maior que ventosa oral, situado posterior a região equatorial do corpo. Pré-faringe indistinta. Faringe subsférica, muscular. Esôfago longo. Ceco longo, afilado, terminando cego próximo a vesícula excretora. Órgão tribocítico subsférico com abertura longitudinal tipo fenda, localizado na região posterior do corpo. Dois testículos primordiais não bem definidos. Ovário primordial oval, pós-testicular, não bem definidos, contíguo com os testículos. Poro genital terminal. Sistema excretor tipo '*diplostomulum*', formado por dois canais laterais ramificados extracecais, um de cada lado formando uma rede no segmento anterior. Concreções excretoras livres, pequenas, redondas ou com formato irregular, muito densa, distribuídas na região anterior do corpo até o nível da ventosa ventral, ultrapassa a ventosa ventral na região intercecal, mas não alcança a margem do órgão tribocítico. Vesícula excretora pequena, em formato de V não proeminente. Poro excretor terminal.

*Sumário taxonômico*

*Segundo hospedeiro intermediário:* *Hemiodontichthys acipenserinus* (Kner) (Siluriformes: Loricariidae), *Tatia* sp. (Siluriformes: Auchenipteridae).

*Sítio de infecção:* Cavidade corporal (*H. acipenserinus*); intestino (*Tatia* sp.).

*Localidade:* rio Jari, Amapá (1°07'31.6"S, 51°59'38.8"W).

*Espécimes representativos:* voucher eletrônico do hologenóforo providenciado na figura suplementar S2.

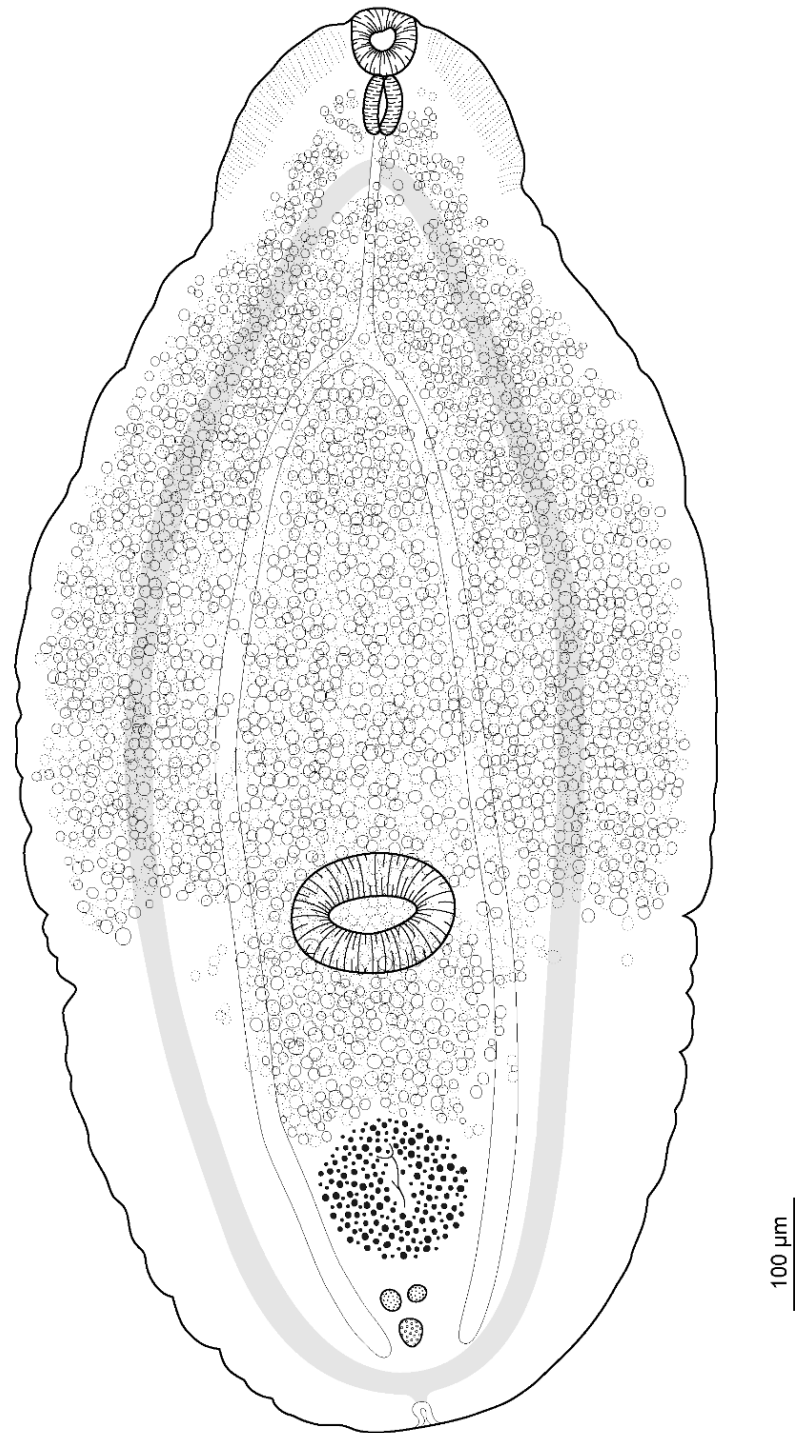
*Sequência de DNA:* 28S: MT187600.

*Comentários*

Proterodiplostomatidae gen. sp. 1 difere das prévias espécies pelo formato do corpo, isto é, oval (vs alongado com região posterior afilada reportado em todas espécies aqui descritas),



lanceolado em Proterodiplostomatidae gen. sp. 1 em Scholz et al. (1995) e *Crocodilicola pseudostoma* de Ferrari-Hoeinghaus et al. (2007), ou bipartido como em *Heterodiplostomum lanceolatum* em Queiroz et al. (2019) e Mañé-Garzon & Alonso (1979); além da ventosa ventral mais larga que órgão tribocítico (*vs* órgão tribocítico mais largo que ventosa ventral em outros proterodiplostomídeos apresentados no presente estudo), ventosa ventral localizada posterior a região equatorial e concreções excretoras distribuídas de forma densa estendendo posterior ao nível equatorial do corpo em região intercecal, além de distintamente menores que em outros proterodiplostomídeos. A metacercária de Proterodiplostomidae gen. sp. 3 difere de todos outros proterodiplostomídeos pela presença de pseudoventosas, por outro lado, uma característica típica dos diplostomoídeos. A presença de pseudoventosas é uma característica da subfamília Proalarioidinae, entretanto uma única espécie, *Proalarioides serpentis* Yamaguti, 1933, tem sido descrita na Índia. Espécimes adultos de Proterodiplostomidae gen. sp. 3 são necessários para confirmar o status genérico.



**Figura 9.** Metacercária de Proterodiplostomidae gen. sp. 3 coletado na cavidade corporal de *Hemiodontichthys acipenserinus* (Kner) no rio Jari, Amapá. Hologenóforo. Vista Ventral.

Subfamília Polycotylinae Monticelli, 1888

Gênero *Prolecithodiplostomum* Dubois, 1936

#### 3.3.4.8 *Prolecithodiplostomum constrictum* Dubois, 1936

*Descrição* (Figuras 10 A, B)

*Adulto* [baseada em um espécime danificado coletado em *Paleosuchus trigonatus*, Localidade: rio Jari, Amapá; um espécime fixado em etanol absoluto, medidas na Tabela 6]: Corpo distintamente bipartido. Segmento anterior lanceolado. Segmento posterior cilíndrico com uma constrição. Ventosa oral não observada. Ventosa ventral subsférica. Ceco afilado, estende lateralmente ao órgão tribocítico, terminando no segmento posterior. Órgão tribocítico elíptico, abertura longitudinal tipo fenda, abertura envolvida internamente por 24 papilas, situado próximo da margem posterior do segmento anterior. Dois testículos, em posição tandem, na metade anterior do segmento posterior. Glândula paraprostática longa, tubular, abertura separada dentro da bolsa copulatória. Duto ejaculatório e útero com abertura em comum. Bolsa copulatória com abertura dorso-subterminal. Ovário redondo, pretesticular. Útero longo, passa lateralmente ao ducto ejaculatório. Ovos grandes, não filamentados. Vitelária folicular com irregular formato, confinado na metade posterior do segmento anterior do corpo; limite posterior próximo ao ovário, anteriormente até o nível da ventosa ventral. Sistema excretor identificado somente na região anterior do corpo com dois ramos laterais e um mediano unidos ao nível da faringe.

*Metacercária* [baseada em espécime coletado em *Cyphocharax leucostictus*, Localidade: rio Jari, Amapá; um espécime fixado em etanol absoluto, medidas na Tabela 5]. Metacercária encistada. Cistos nas brânquias. Corpo alongado, achatado. Ventosa oral pequena, subsférica muscular, terminal. Pseudoventosas ausentes. Ventosa ventral subsférica, maior que ventosa oral, situado posteriormente ao meio do corpo. Pré-faringe ausente. Faringe subsférica. Esôfago longo. Ceco longo, afilado, terminando cegamente posterior ao órgão tribocítico ao nível dos órgãos genitais primordiais. Órgão tribocítico subsférico com abertura envolvida internamente por 10 papilas, na região posterior do corpo. Dois testículos primordiais, não bem definidos. Ovário primordial oval, pós-testicular, não bem definido, contíguo aos testículos. Sistema excretor do tipo '*diplostomulum*', formado por dois canais extracecais ramificados laterais em cada lado formando uma rede no segmento anterior. Concreções excretoras livres,

redondas ou com formato irregular, grandes na região central do corpo e pequenas e irregular próximo as bordas do corpo, predominantemente dorsal, denso, distribuídas amplamente na região anterior do corpo alcançando a ventosa oral até o nível da ventosa ventral, distribuída na região intercecal após a ventosa ventral, alcançando o órgão tribocítico. Vesícula excretora em formato de Y. Poro excretor terminal.

#### *Sumário Taxonômico*

*Hospedeiro definitivo: Paleosuchus trigonatus* (Schneider) (Crocodylia: Alligatoridae).

*Segundo hospedeiro intermediário: Cyphocharax leucostictus* (Eigenmann & Eigenmann) (Characiformes: Curimatidae).

*Sítio de infecção no hospedeiro: intestino (P. trigonatus); brânquias (C. leucostictus).*

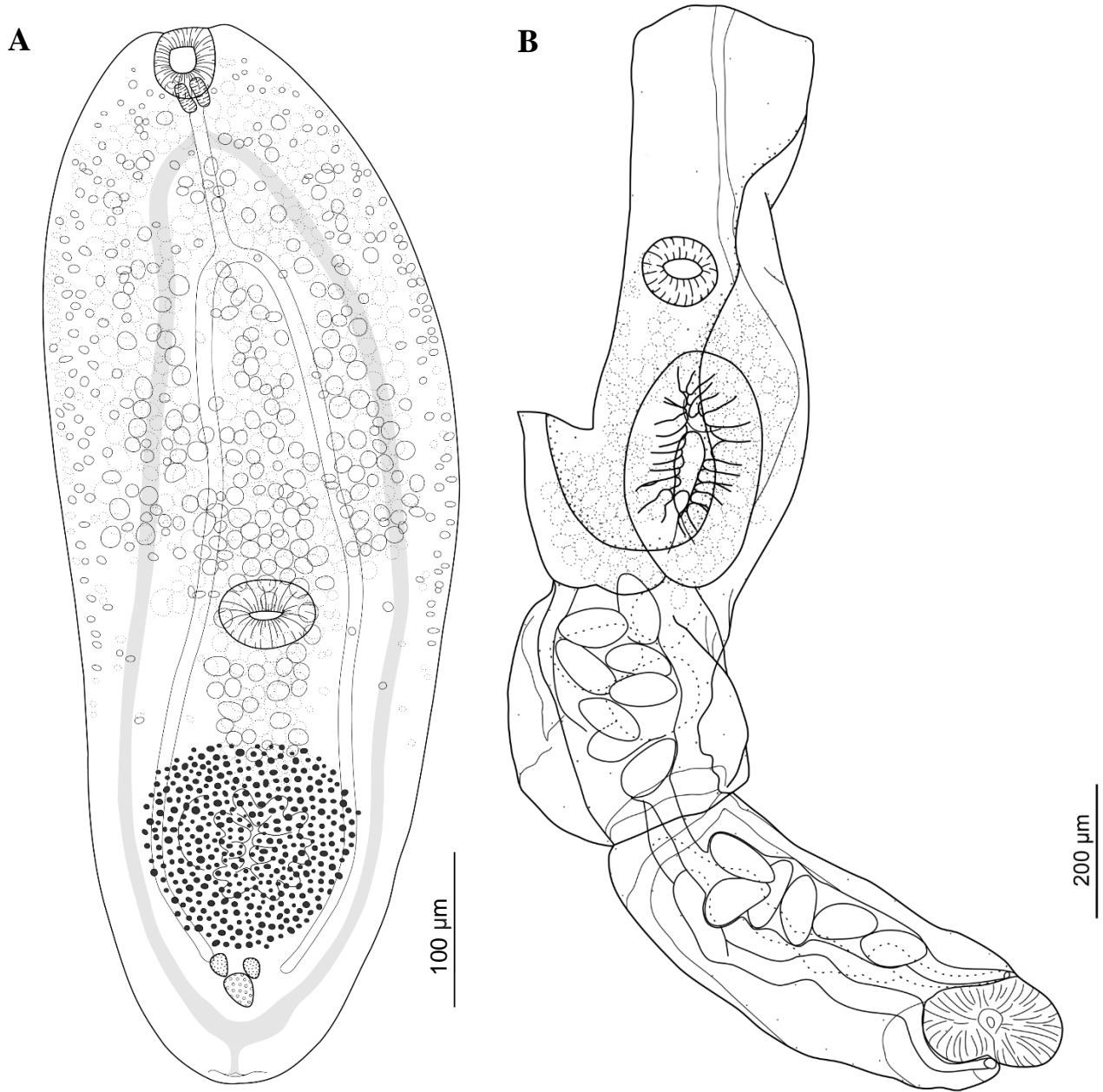
*Localidades: rio Jari, Amapá (1°07'31.6"S, 51°59'38.8"W).*

*Espécimes representativos: hologenóforo de Paleosuchus trigonatus a ser depositado; voucher eletrônico do espécime em estágio de metacercária como hologenóforo é providenciado na figura suplementar S2.*

*Sequências DNA: 28S: MT187601–2; cox1: MT185368–9.*

#### *Comentários*

O espécime adulto recuperado de *P. trigonatus* concorda bem com o diagnóstico do gênero de acordo com Niewiadomska (2002c) ao apresentar corpo distintamente bipartido, glândula parapróstática longa, tubular, abertura separada dentro da bolsa copulatória, duto ejaculatório e útero com abertura em comum. O presente espécime apresenta constricção no segmento posterior e bolsa copuladora reduzida a uma abertura, bem como as prévias descrições para a espécie. A identificação da metacercária foi possibilitada pela correspondência com a sequência do espécime adulto, permitindo uma elucidação parcial do seu ciclo de vida. A comparação das sequências de ambos estágios revelaram uma única diferença nucleotídica na região *cox1* parcial sequenciada e sequências idênticas no 28S rDNA. Comparações entre as sequências das demais espécies de proterodiplostomídeos aqui analisados revelaram divergência genética variando de 19,6-20,9% para *cox1* e 2,9-3,8% para o rDNA 28S.



**Figura 10.** *Prolecithodiplostomum constrictum*. Hologenóforo. **A.** Metacercária coletada nas brânquias de *Cyphocharax leucostictus* (Eigenmann & Eigenmann). **B.** Adulto coletado no intestino de *Paleosuchus trigonatus* (Schneider). Vista ventral.

**Tabela 6.** Dados morfométricos comparativos para adultos de *Prolecithodiplostomum* spp.

Espécie	<i>Prolecithodiplostomum constrictum</i> Dubois	<i>Prolecithodiplostomum constrictum</i> Dubois	<i>Prolecithodiplostomum constrictum</i> Dubois	<i>Prolecithodiplostomum constrictum</i> Dubois	<i>Prolecithodiplostomum cavum</i> Dubois	<i>Prolecithodiplostomum cavum</i> Dubois
Hospedeiro	<i>Paleosuchus trigonatus</i> (Schneider)	<i>Caiman crocodilus</i> (Linnaeus)	<i>Caiman</i> sp.	<i>Caiman yacare</i> (Daudin)	<i>Caiman crocodilus</i> (Linnaeus)	<i>Caiman crocodilus fuscus</i> (Cope)
Localidade	Rio Jamari, Amapá, Brasil	Brasil	Brasil	Mato Grosso do Sul, Brasil	Brasil	Sucre, Colombia
Referência	Presente estudo	Dubois, 1936b	Ruiz & Rangel (1954)	Catto & Amato (1994)	Dubois, 1936b	Alvarez et al. (2005)
Tamanho amostral	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 2	<i>n</i> = 20	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 5
CT	2.314	3.300–3.800	–	1.400–2.760 (2.120)	2.760–3.160	2.240–3.100 (2.670)
CSA	1.121	1.500–1.700	1.408	890–1.610	1.530–1.720	960–1.220 (1.090)
LSA	482	530–760	844–901	274–805 (486)	420–600	640–810 (720)
CSP	1.172	1.700–2.100	1.470–1.619	380–1.180 (920)	1.230–1.440	1.180–1.620 (1.400)
LSP	408	400–510	430–633	146–622 (338)	270–510	320–680 (500)
CVO	34	53–60	43	51–95 (66)	46–60	59–71 (65)
LVO	39	50–72	67	44–88 (70)	60–62	55–71 (63)
CVV	150	105–115	141–158	58–124 (95)	90–120	85–111 (97)
LVV	127	120–130	185–197	80–146 (111)	120–135	119–143 (120)
CPF	–	10	–	–	–	–
CF	33	48–53	43–50	44–66 (53)	44–50	31–53 (42)
LF	21	42–47	–	36–58 (42)	41–45	33–55 (44)
CE	–	–	–	51–160 (90)	130–140	–
LE	–	–	–	–	15–40	–
COT	344	315–540	380–422	183–311 (250)	360	310–330 (320)
LOT	239	230–430	309–352	128–384 (204)	180–200	190–210 (200)
COV	–	100–150	126–154	37–91 (67)	115–120	85–105 (90)
LOV	–	100–125	183–281	37–128 (89)	100	119–145 (120)
CTA	73	140–260	211–225	55–128 (99)	135–153	99–180 (130)
LTA	125	140–250	309–352	91–220 (126)	130–153	159–187 (160)
CTP	83	140–270	197–252	55–128 (102)	135–151	131–161 (140)
LTP	125	140–300	267–422	82–219 (152)	126–153	119–145 (132)
CO	100–109	90–99	–	80–102 (90)	82–94	87–95 (91)
LO	58–67	55–62	–	44–66 (59)	49–60	67–77 (72)
DVVAC	503	–	–	–	–	–
DVVPSA	1676	–	–	–	–	–
DVV-OT	94	–	–	–	–	–

*Abreviações:* CT, comprimento total do corpo; CSA, comprimento do segmento anterior; LSA, largura do segmento anterior; CSP, comprimento do segmento posterior; LSP, largura do segmento posterior; CVO, comprimento da ventosa oral; LVO, largura da ventosa oral; CVV, comprimento da

ventosa ventral; LVV, largura da ventosa ventral; CPF, comprimento da pré-faringe; CF, comprimento da faringe; LF, largura da faringe; CE, comprimento do esôfago; LE, largura do esôfago; COT, comprimento do órgão tribocítico; LOT, largura do órgão tribocítico; COV, comprimento do ovário; LOV, largura do ovário; CTA, comprimento do testículo anterior; LTA, largura do testículo anterior; CTP, comprimento do testículo posterior; LTP, largura do testículo posterior; CO, comprimento do ovo; LO, largura do ovo; DVVAC, distância entre ventosa ventral à extremidade anterior do corpo; DVVPSA, distância entre ventosa ventral à margem posterior do segmento anterior; DVV-OT, distância entre a ventosa ventral e o órgão tribocítico.

### 3.4 DISCUSSÃO

O presente estudo apresenta a discussão sobre a diversidade de espécies de proterodiplostomídeos em hospedeiros intermediários (peixes) e definitivos (répteis) no Brasil, além de expandir os bancos de dados *cox1* e 28S para os diplostomídeos do "Novo Mundo", fornecendo dados de sequência para um total de oito espécies distintas. Nosso estudo representa apenas um pequeno passo para as descobertas de sua diversidade genética juntamente com a caracterização morfológica dos estágios larval e adulto deste grupo, o que nos permitiu elucidar parcialmente o ciclo de vida de *P. constrictum* por meio de dados de sequências correspondentes de ambos estágios.

#### *Monofilia dos Proterodiplostomidae*

Proterodiplostomidae compreendeu um grupo monofilético dentro de Diplostomoidea com alto suporte nodal. Filogenias anteriores baseadas em dados de sequências limitadas à *C. pseudostoma* e *H. lanceolatum* revelaram Proterodiplostomidae como irmã mais basal aos parafiléticos Diplostomidae + Strigeidae, relatando uma posição basal não resolvida (HERNÁNDEZ-MENA et al., 2017; QUEIROZ et al., 2019). Apesar dos resultados conflitantes e ambíguos dos estudos anteriores em relação à posição de Proterodiplostomidae em Diplostomoidea, nossa topologia claramente colocou Proterodiplostomidae como irmã da tribo Strigeini de Strigeidae. Proterodiplostomidae + Strigeidae (s.s.) + Diplostomidae (s.s.) agruparam como mais próximos, embora com pouco suporte estatístico, isso contrasta com a percepção anterior em relação à posição basal dos proterodiplostomídeos na superfamília. Com base na filogenia obtida, o tipo 'proterodiplostomulum' não basal é um fator consistente com a posse de cistos transparentes e de camada fina em diferentes órgãos do segundo hospedeiro intermediário. No que diz respeito ao hospedeiro definitivo, embora se acreditasse em uma tendência de répteis através de aves até a colonização de hospedeiros mamíferos pudesse ser traçada (SHOOP, 1989), isso não foi suportado na atual amostragem de táxons.

#### *Amplas relações filogenéticas entre os diplostomídeos*

Nossos resultados confirmaram a parafilia de Diplostomidae (Figura 1). Ambas famílias, Diplostomidae e Strigeidae, foram submetidas a extensos esforços de amostragem e



análises filogenéticas e em estudos anteriores ambas famílias foram recuperadas como parafiléticas (OLSON et al., 2003; FRAIJA-FERNÁNDEZ et al., 2015; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017; HERNÁNDEZ-MENA et al., 2017; PÉREZ-PONCE DE LEON & HERNÁNDEZ-MENA, 2019). Hernández-Mena et al. (2017) realizaram a primeira reavaliação molecular de Diplostomoidea incluindo uma única sequência para proterodiplostomídeo, uma metacercária de *C. pseudostoma*. Há o consenso entre os prévios estudos de que o atual conceito de Diplostomoidea é insatisfatório e considera-se necessária uma reavaliação dos caracteres morfológicos, juntamente com uma amostragem mais ampla com dados moleculares, para conclusões adicionais sobre as relações e estrutura real da superfamília.

Nossa filogenia recuperou membros de Diplostomidae em três linhagens distintas: (i) Diplostomidae (*s.s.*) (incluindo os gêneros *Austrodiplostomum* + *Diplostomum* + *Tylodelphys* + *Alaria*), todos caracterizados por metacercárias do tipo 'diplostomulum' sem cisto; (ii) membros de Crassiphialinae em dois subclados aqui denominados 1 e 2, ambos caracterizados com metacercárias do tipo 'neascus'; e (iii) *Codonocephalus* + *Neodiplostomum* + "Diplostomidae sp. VVT-2015" + *Hysteromorpha triloba* agrupados em um clado mal suportado, juntamente com os estrigeídeos *Cotylurus* + *Ichthyocotylurus* + *Nematostrigea*.

Além dos membros do clado acima mencionados, os membros de Strigeidae foram resolvidos em dois clados adicionais: (i) *Apharyngostrigea* + *Parastrigea* + *Strigea* + *Apatemon* + *Australapatemon* e (ii) um clado composto apenas por membros de *Cardiocephaloides*. Duas tribos, "Strigeini" e "Cotylurini", foram reconhecidas dentro de Strigeinae por Dubois (1938b) com base em seu grupo de hospedeiro definitivo e distribuição dos folículos vitelínicos. Estas tribos foram posteriormente elevadas ao nível de subfamília por Sudarikov (1959), no entanto, essa subdivisão não foi reconhecida por alguns autores como Hernández-Mena et al. (2017), Blasco-Costa & Locke (2017) e Choudhary et al. (2019) que a rejeitaram com base em análises filogenéticas. Diversos estudos têm encontrado a família agrupada em dois clados parafiléticos: (i) clado 1 com *Apharyngostrigea* + *Parastrigea* + *Strigea* + *Apatemon* + *Australapatemon* e (ii) clado 2 com *Cardiocephaloides* + *Cotylurus* + *Ichthyocotylurus* + *Nematostrigea* (HERNÁNDEZ-MENA et al., 2017; BLASCO-COSTA & LOCKE 2017). Estes clados diferem das tribos de Dubois pelo gênero *Apatemon* e *Australapatemon* (esse último descrito posterior ao trabalho de Dubois) agruparem no clado 1, correspondente à tribo 'Strigeini', apesar de apresentarem a distribuição da vitelária correspondente à 'Cotylurini', portanto os resultados moleculares não condizem com a concepção de que a distribuição da vitelária é um

bom caráter diferenciador. Contudo, esta nomenclatura ainda é utilizada adequando as informações geradas por análises moleculares. Partindo deste princípio de adaptação da classificação utilizamos estas nomenclaturas no presente estudo. Apesar de estudos prévios sugerirem a elevação destes clados ao nível de família, alguns autores julgam prudente a inclusão de dados moleculares referentes aos outros três gêneros pertencentes à Strigeidae na qual atualmente não apresentam qualquer dado desta natureza disponíveis. A árvore filogenética para 28S aqui analisada apresentou agrupamento similar ao discutido.

A sugestão de uma revisão completa da família Strigeidae é relevante também para os Diplostomidae (BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017). A ausência de monofilia para a subfamília Crassiphialinae foi relatada por Achatz et al. (2019a), enquanto outros estudos demonstraram a presença desta (BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017; HERNÁNDEZ-MENA et al. 2017; LOCKE et al., 2018). Sob a atual amostragem de táxons, a monofilia de Crassiphialinae foi confirmada com membros agrupados em dois clados irmãos monofiléticos, isto é, Crassiphialinae clado 1 e Crassiphialinae clado 2 *sensu* Achatz et al. (2019a). Conforme sugerido por Achatz et al. (2019a) a subfamília precisa ser revisada, exigindo mais subdivisões. Os membros do clado *Crassiphiala* + *Uvulifer* são caracterizados com folículos vitelínicos restritos ao corpo posterior. Dois outros gêneros de Crassiphialinae, *Cercocotyia* e *Pseudodiplostomum*, também são caracterizados com folículos vitelínicos restritos ao corpo posterior, no entanto, atualmente não existem dados moleculares para nenhum de seus membros.

O morfotipo das metacercárias tem sido reconhecido como importante recurso diagnóstico em nível familiar para diplostomóides (SHOOP, 1989; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017) com espécies apresentando morfotipos particulares agrupados de forma congruente com base em dados moleculares (LOCKE et al., 2018). De acordo com filogenias anteriores (BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017) nossa árvore filogenética revela uma tendência evolutiva a partir de cistos de paredes espessas e multicamadas como uma divergência anterior tipo ‘prohemistomulum’ através do cistos em camadas dos tipos ‘prodiplostomulum’, ‘neascus’, ‘tetracotyle’ e ‘proterodiplostomulum’ para as mais recentemente divergentes metacercárias do tipo ‘diplostomulum’ não encistadas no topo da árvore. Esta narrativa é suportada pela evidência de adaptação ecológica e troca de hospedeiros, seguido por uma tendência de taxa generalista basal que irradia para taxa especialista (BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017).

Na última grande revisão da superfamília, Niewiadomska (2002a) reconheceu como válidos quatro morfotipos de metacercárias diplostomóides, ou seja, ‘neascus’, ‘diplostomulum’, ‘tetracotyle’ e ‘prohemistomulum’. Entretanto os tipos ‘proterodiplostomulum’, ‘prodiplostomulum’ e ‘neodiplostomulum’ anteriormente reconhecidos não foram considerados distintos, apesar da indicação de consistentes características morfológicas em relação ao seu sistema excretor. Nossa análise filogenética fornece evidência para a reconsideração destes tipos previamente reconhecidos. O tipo ‘proterodiplostomulum’ foi reconhecido por Shoop (1989) como característica da família Proterodiplostomidae e descreve metacercárias encistadas nas vísceras em peixes que possuem a maior preponderância de caracteres primitivos entre Diplostomoidea. As metacercárias examinadas no presente estudo concordam com o conceito de ‘proterodiplostomulum’, a qual consideramos válido.

Entre o material examinado neste estudo, um único isolado de metacercária da espécie provisoriamente identificado como Proterodiplostomidae gen. sp. 1 foi recuperado livre no intestino do ciclídeo *Cichla monoculus*. Consideramos que esse peixe não é um hospedeiro definitivo típico e que a metacercária encontrada permaneceu no trato digestivo após a predação recente de um hospedeiro intermediário infectado, isto baseado no micro-habitat em que a metacercária foi recuperada e a ausência de cisto. Todas as outras metacercárias do tipo ‘proterodiplostomulum’ foram recuperadas encistadas em diferentes órgãos internos, incluindo os lobos ópticos do cérebro e olho. Isto contrasta com as metacercárias do tipo ‘diplostomulum’ tipicamente sem cisto e que tendem a se estabelecer em microhabitats com resposta imune do hospedeiro reduzida, como o sistema nervoso e os olhos. A presença de metacercárias encistadas no sistema nervoso e nos olhos do peixe pode resultar de uma migração atípica através do sistema circulatório.

Como vimos anteriormente, metacercárias do tipo ‘tetracotyle’ podem ser divididas em dois subtipos para membros Strigeidae. O tipo ‘tetracotyle Strigeini’ na maioria dos casos resulta em um estágio de mesocercária e tende a se restabelecer em hospedeiros paratênicos (PEARSON, 1959). Caracteres distintos para este tipo de metacercária são o cisto consideravelmente mais espesso, a presença de glândulas orais, maciças pseudoventosas ao nível da ventosa ventral e ventosa ventral protrusível. Enquanto as metacercárias do tipo ‘tetracotyle Cotylurini’ se distinguem por formato piriforme, cistos finos e transparentes, pseudoventosas ao nível da ventosa oral e distinta bexiga de reserva que forma uma rede espessa. Nossa análise filogenética recuperou dois clados com membros que possuem esse

subtipo de metacercária: (i) clado ‘Cotylurini’ de Strigeidae com metacercárias recuperadas encistadas no sistema nervoso dos peixes como hospedeiros intermediários e (ii) clado com suporte insuficiente constituído por representantes estrigeídeos e diplostomídeos, isto é, *Cotylurus* + *Nematostrigea* + *Ichthyocotylurus* + *Codonocephalus* + *Neodiplostomum* + “Diplostomidae sp. VVT-2015 ”+ *Hysteromorpha triloba*. Os membros desse clado são caracterizados por várias peculiaridades em relação às suas estratégias de ciclo de vida. Espécies de *Cotylurus* tendem a se encistar em gastrópodes e sanguessugas, *Codonocephalus* forma metacercárias progenéticas em anuros como segundos hospedeiros intermediários (ACHATZ et al., 2019c) e *Neodiplostomum* geralmente é encontrado em anfíbios. *Neodiplostomum* foi anteriormente reconhecido com uma metacercária do tipo ‘neodiplostomulum’ (ODENING, 1965; SHOOP, 1989) na qual é caracterizado com mais caracteres derivados do que o tipo ‘diplostomulum’, Niewiadowska (2002a) considerou ‘neodiplostomulum’ uma variação/subtipo do ‘diplostomulum’. Metacercárias bem caracterizadas, juntamente com relevantes dados de sequências, irão esclarecer as estratégias de ciclo de vida dos diplostomóides.

Deslizando ainda mais na árvore, as espécies caracterizadas com metacercárias do tipo ‘neascus’ formaram dois cladogramas: (i) Crassiphialinae clado 1, na qual as metacercárias possuem cistos de várias camadas, finos e pigmentados e (ii) Crassiphialinae clado 2, composto por espécies com cistos transparentes e em camadas finas. As espécies de *Bolbophorus* previamente reconhecidas por possuírem metacercária do tipo ‘prodiplostomulum’ (SHOOP, 1989), com cistos transparentes e de camada fina, foram recuperados como basal para o subtipo ‘neascus’ com mesmo tipo de cisto (Crassiphialinae clado 2). Shoop (1989) reconheceu a metacercária do tipo ‘prodiplostomulum’ como um intermediário na morfologia entre o ‘neascus’ e o ‘diplostomulum’ ao possuir os estados ancestrais de encistamento do ‘neascus’, presença de um plexo paranefridial com numerosas pequenas anastomoses e parasitar peixes; mas também apresentar pseudoventosa e redução de comissuras transversais no plexo paranefridial como caracteres comuns de metacercárias do tipo ‘diplostomulum’.

Os morfotipos de metacercárias atualmente reconhecidos precisam ser revisados. Os ciclos de vida dos diplostomóides ainda permanecem amplamente desconhecidos para quase metade dos gêneros conhecidos (BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017). No ciclo de vida dos trematódeos, o estágio de metacercária foi o último a aparecer e esta adaptação permitiu o aumento da diversidade morfológica refletida por sua relação com o ambiente local e com o organismo a qual parasitam (PEARSON, 1972; GIBSON, 1987; GALAKTIONOV &

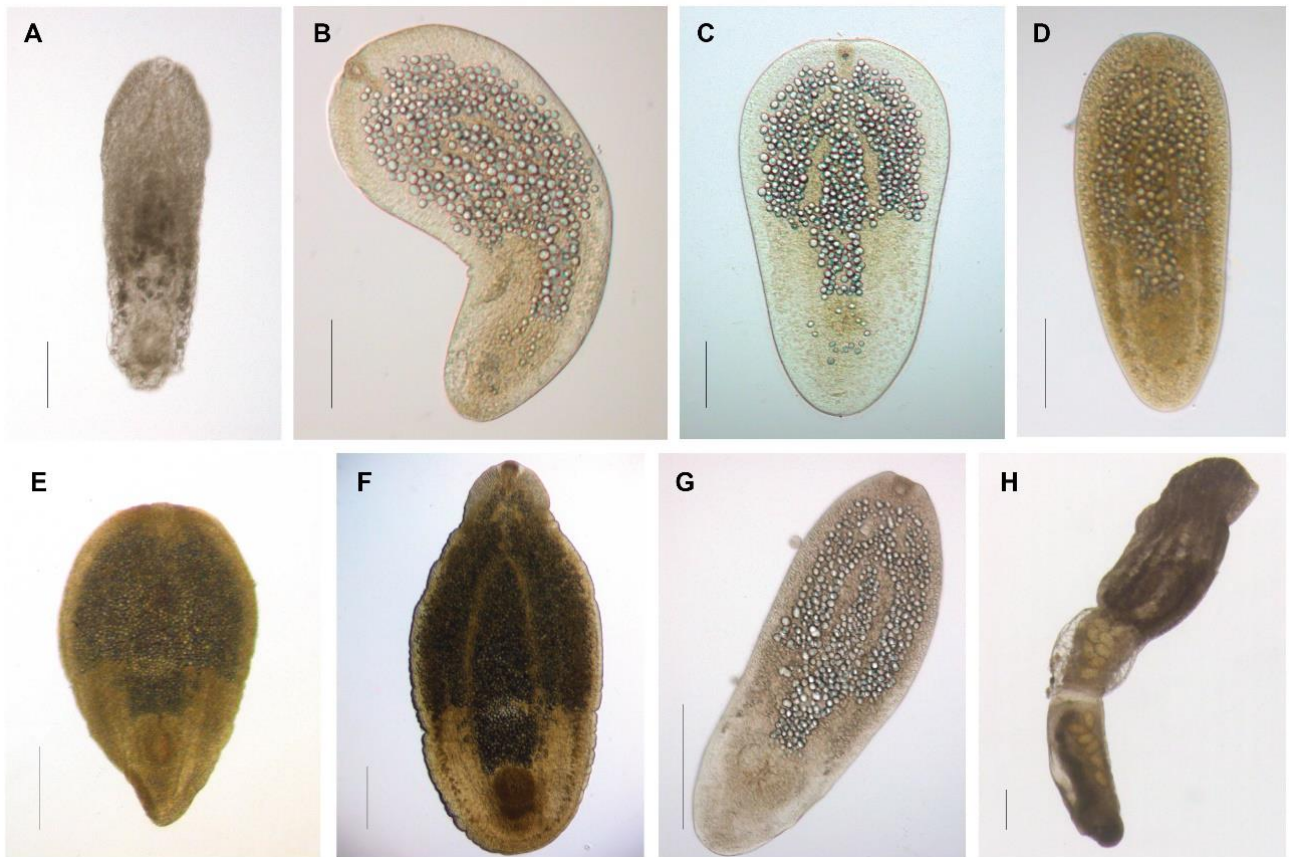
DOBROVOLSKJJ, 2003). A importância das informações da história da vida e dos caracteres morfológicos de todas as etapas do ciclo de vida tem sido reconhecida pelas classificações genéricas e superiores de Diplostomoidea (NIEWIADOMSKA, 1973, 2002a; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017; LÓPEZ-JIMENEZ et al. 2017).

O presente estudo aumentou substancialmente a amostragem de táxons para proterodiplostomídeos. As análises filogenéticas revelaram um grupo impressionantemente rico em relação à diversidade de espécies e estratégias de ciclo de vida. Faltam dados sobre o ciclo de vida e o uso de segundos hospedeiros intermediários para uma ampla gama de diplostomídeos, sendo necessários mais estudos incluindo avaliação morfológica completa, dados genéticos e elucidções do ciclo de vida para entender melhor a evolução dos diplostomídeos. A adaptação do estágio de metacercária parece ter desempenhado um papel importante na diversificação e evolução do diplostomídeos. A apresentação de dados moleculares junto a características das metacercárias fornece uma compreensão mais profunda da evolução em direção à adaptação.

O presente estudo destaca a morfologia da metacercária como importante no rastreamento da divergência e evolução de diplostomídeos, bem como característica de suporte no nível familiar. Com base no material avaliado, a metacercária do tipo 'proterodiplostomulum' é revalidada e é fornecida uma nova visão da estrutura da Diplostomoidea.



**Figura S1.** Fotomicrografias de proterodiplostomídeos; **A.** Adulto de *Proterodiplostomum longum* coletado no intestino de *Caiman latirostris* no rio Guandu, Rio de Janeiro. Metacercária de *Proterodiplostomum* spp.; **B-C.** *Proterodiplostomum* sp. 1 provindo de vesícula biliar de *Trachydoras paraguayenses* do rio Paraná, Paraná; **D.** *Proterodiplostomum* sp. 1 coletado na cavidade do corpo de *Trachelyopterus galeatus* no rio Paraná, Paraná; **E.** *Proterodiplostomum* sp. 2 da lente do olho de *Pimelodus fur* do rio Miranda, Mato Grosso do Sul. Barras de escala: **A.** 58 mm; **B-E.** 200  $\mu$ m.



**Figura S2.** Fotomicrografias de proterodiplostomídeos; **A.** *Proterodiplostomum* sp. 3 coletado no estômago de *Phalacrocorax brasilianus* no rio Jari, Amapá; **B.** *Proterodiplostomum* sp. 3 na cavidade cranial de *Hemiodontichthys acipenserinus* no rio Jari, Amapá; **C.** *Proterodiplostomum* sp. 3 no intestino de *Hemiodus unimaculatus* do rio Jari, Amapá; **D.** Proterodiplostomidae gen. sp. 1 no intestino de *Cichla monoculus* do rio Jari, Amapá; **E.** Metacercária de Proterodiplostomidae gen. sp. 2 na cavidade cranial em *Cichla monoculus* do rio Jari, Amapá, vista dorsal; **F.** Metacercária de Proterodiplostomidae gen. sp. 3 na cavidade corporal de *Hemiodontichthys acipenserinus* no rio Jari, Amapá; **G.** Metacercária de *Prolecithodiplostomum* sp. nas brânquias de *Cyphocarax leucostictus* no rio Jari, Amapá; **H.** Adulto de *Prolecithodiplostomum* sp. no intestino de *Paleosuchus trigonatus* no rio Jari, Amapá. Barra de escala: **A-D.** 100 µm; **E-H.** 200 µm.

#### **4. CAPÍTULO II –**

### **CRASSIPHIALINAE SUDARIKOV, 1960 (DIGENEA: DIPLOSTOMIDAE): NOVAS ESPÉCIES, FILOGENIA E DOENÇA DOS PONTOS PRETOS**



## RESUMO

É amplamente aceito que a biodiversidade reduzida afeta as dinâmicas de transmissão dos parasitos patogênicos, aumentando ou diminuindo-os. Considera-se que as áreas de biodiversidade naturalmente alta servem como fonte de novos patógenos. Revelar a diversidade de patógenos e entender suas histórias evolutivas é de importância central para compreender os processos de especiação de parasitos, associações de hospedeiros, biologia e ecologia. A região neotropical mantém imensa biodiversidade e ainda permanece amplamente inexplorada em relação aos parasitos metazoários. Os diplostomídeos da subfamília Crassiphialinae Sudarikov, 1960 são parasitos de aves quando adultos, com distribuição mundial e seus estágios de metacercária são considerados principais patógenos em peixes de água doce que podem influenciar severamente as condições dos hospedeiros e geralmente causam a "doença dos pontos pretos". Membros da família Heterophyidae Leiper, 1909 também foram associados como causadores da "doença dos pontos pretos". Os ciclos de vida da parte predominante dos patógenos dos "pontos pretos" são amplamente desconhecidos. Isso se deve parcialmente à natureza problemática da identificação de espécies no estágio de metacercária, resultante da alta homogeneidade dos caracteres morfológicos. Como parte de uma pesquisa de triagem em larga escala da fauna brasileira de peixes de água doce para infecções por parasitos trematódeos, recuperamos um total de 9 espécies de crassifialinos. O exame morfológico das amostras recuperadas e as análises filogenéticas reconstruídas a partir de ambos genes, mitocondrial *cox1* e nuclear 28S rDNA, revelaram que elas pertencem a duas espécies de *Uvulifer* Yamaguti, 1934 e seis de *Posthodiplostomum* Dubois, 1936, todas novas. Recuperamos *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin) e *Ardea cocoi* Linnaeus infectados com espécimes maduros (gravíticos) e imaturos de uma espécie de *Uvulifer* e quatro de *Posthodiplostomum*, provisoriamente identificados como *Uvulifer* sp. 5 de *P. brasilianus* e *Posthodiplostomum* sp. 10 – 12, 15. Elucidações parciais do ciclo de vida foram alcançadas para três das espécies de *Posthodiplostomum*, identificadas provisoriamente como *Posthodiplostomum* sp. 10, *Posthodiplostomum* sp. 12 e *Posthodiplostomum* sp. 15 via dados de sequência correspondentes de isolados de adultos e metacercárias. É dada ênfase à morfologia das metacercárias e seus caracteres taxonômicos dentro de Crassiphialinae. Nossas descobertas destacam a importância da aplicação da abordagem integrativa ao estudo de espécies com ciclos de vida complexos e relatam mais dados sobre a diversidade anteriormente desconhecida na região neotropical.

**Palavras-chave:** Crassiphialinae, sistemática, doença dos pontos pretos

## ABSTRACT

It is widely accepted that reduced biodiversity affects the transmission dynamics of pathogen parasites either by increasing or decreasing them. The naturally high biodiversity areas are considered to serve as a source pool for new pathogens. Revealing pathogen diversity and understanding their evolutionary histories is of central importance to understand parasite speciation processes, their host associations, biology and ecology. The Neotropics holds immense biodiversity and still remain largely unexplored in respect to metazoan parasites. Diplostomid trematodes of the subfamily Crassiphialinae Sudarikov, 1960 are parasites of birds as adults with worldwide distribution and their metacercarial stages are considered major pathogens in freshwater fish that can severely influence hosts' conditions and often cause "black spot disease". Members of the family Heterophyidae Leiper, 1909 have also been associated as "black spot disease" causatives. The life-cycles of predominant part of the "black spot disease" pathogens are largely unknown. This is partially due to the problematic nature of the species identification at metacercarial stage resulting due to the high homogeneity of morphological characters. As a part of a large-scale screening survey of the Brazilian freshwater fish fauna for trematode parasite infections we recovered a total of 9 crassiphialine species. Morphological examination of the specimens recovered and phylogenetic analyses reconstructed from both mitochondrial *cox1* and nuclear 28S rDNA genes revealed that these belong to two species of *Uvulifer* Yamaguti, 1934 and six of *Posthodiplostomum* Dubois, 1936, all putative new. We recovered *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin) and *Ardea cocoi* Linnaeus infected with both mature (gravid) and immature specimens of one species of *Uvulifer* and four of *Posthodiplostomum* (tentatively identified as *Uvulifer* sp. 5 ex *P. brasilianus* and *Posthodiplostomum* sp. 10 – 12, 15). Partial life-cycle elucidations were achieved for three of the species of *Posthodiplostomums*, provisionally identified as *Posthodiplostomum* sp. 10, *Posthodiplostomum* sp. 12 e *Posthodiplostomum* sp. 15 via matching sequence data from both adult and metacercarial isolates. Emphasis on the metacercarial morphology and their taxonomic characters within the Crassiphialinae is placed. Our findings highlight the importance of the application of integrative approach to the study of species with complex life-cycles and further report on previously unrecognised diversity in the Neotropics.

**Palavras-chave:** Crassiphialinae, systematic, black spots disease

## 4.1 INTRODUÇÃO

Diplostomidae Poirier, 1886 consiste em um grupo diverso de parasitos amplamente distribuídos mundialmente que infectam aves e mamíferos em seu estágio adulto (NIEWIADOMSKA, 2002b; HORÁK et al. 2019). Atualmente é subdividido em quatro subfamílias, isto é, Diplostominae Poirier, 1886; Crassiphialinae Sudarikov, 1960; Alariinae Hall e Wigdor, 1918; Codonocephalinae Sudarikov, 1959 sob os critérios de especificidade ao hospedeiro definitivo e o morfotipo de metacercária (NIEWIADOMSKA, 2002b).

Segundo Niewiadomska (2002b) a distinção entre as subfamílias Diplostominae e Crassiphialinae apresentam uma linha tênue com alguns pontos ainda inconsistentes. Levando em consideração que muitas espécies não possuem os estágios larvais conhecidos, a principal distinção entre ambas subfamílias, para indivíduos no estágio adulto, é a distribuição da vitelária, isto é, Crassiphialinae com folículos vitelínicos restritos ao segmento posterior do corpo e Diplostominae com folículos na região anterior e posterior. Além de outros caracteres como o formato do órgão tribocítico e dos testículos. Entretanto alguns gêneros de Crassiphialinae possuem a metacercária do tipo ‘neascus’ e os adultos apresentam os folículos vitelínicos em ambas partes do corpo, além da estrutura do órgão tribocítico corresponder ao definido para Diplostominae (NIEWIADOMSKA, 2002b). Podemos perceber, portanto, que há uma aparente dificuldade de classificar indivíduos membros destas subfamílias quando adultos, além da necessidade de reavaliação destes grupos em diferentes estágios de vida. As características consideradas mais consistentes na distinção de ambas subfamílias ainda se referem aos estágios de cercária e metacercária, isto é, características do tipo ‘diplostomulum’ para Diplostominae e ‘neascus’ para Crassiphialinae, além da já citada especificidade ao hospedeiro definitivo (GIBSON, 1996; NIEWIADOMSKA, 2002b).

As metacercárias são classificadas por nomes genéricos ou tipos morfológicos devido à dificuldade de identificação dos espécimes, seja por estarem em desenvolvimento ou por serem similares entre gêneros relacionados (NIEWIADOMSKA, 2002a). Esta classificação é considerada critério importante de distinção utilizada para classificação taxonômica, por exemplo, *Ornithodiplostomum* e *Posthodiplostomum* foram alocados na subfamília Crassiphialinae devido à metacercária do tipo ‘neascus’ (NIEWIADOMSKA, 2002a); além de permitir agrupar espécies identificadas ou não como feito por Hughes (1927) ao descrever *Neascus ambloplitis*, espécie que posteriormente seria designada ao gênero *Uvulifer*.

No presente capítulo abordaremos os gêneros *Posthodiplostomum* Dubois, 1936 e *Uvulifer* Yamaguti, 1934 que pertencem à subfamília Crassiphialinae. O gênero *Uvulifer* apresenta duas particularidades, isto é, as metacercárias são encontradas em cistos enegrecidos e os hospedeiros definitivos são espécies da família Alcedinidae Rafinesque, 1815 conhecidos popularmente como Martim-pescador (NIEWIADOMSKA, 2002b; SUBAIR et al., 2013). *Posthodiplostomum* por sua vez não apresenta especificidade à uma família de hospedeiros, apesar de grande parte dos registros compreenderem a família Ardeidae Leach, 1820. Uma vez pertencentes a subfamília Crassiphialinae, ambos gêneros possuem metacercárias do tipo ‘neascus’. Segundo Niewiadomska (2002a) isto significa que encistam, apresentam região anterior do corpo foliácea ou oval e a região posterior do corpo bem desenvolvida, sistema excretor formado por uma ramificação mediana e dois canais laterais formando uma rede na região anterior, canais excretores medianos conectados ou não na região posterior do corpo e corpos excretores livres em canais.

O ciclo de vida de ambos gêneros envolve aves que se alimentam de peixes como hospedeiros definitivos, caramujos como primeiro hospedeiro intermediário e peixes como segundo hospedeiro intermediário. Grande parte do ciclo de vida dos membros destes grupos são desconhecidos, enquanto o ciclo de vida de algumas espécies de *Posthodiplostomum* são bem descritos e conhecidos (OSTROWSKI, 1973; RITOSSA et al. 2013), existem somente duas espécies na qual o ciclo de vida é conhecido para o outro grupo, isto é, *Uvulifer ambloplitis* (Hughes, 1927) Dubois, 1938 e *Uvulifer iruvettiensis* Subair, Brinesh, Janardanan, 2013, ambos conhecidos por meio de estudos experimentais (QUIST et al., 2007; SUBAIR et al., 2013; LÓPEZ-JIMÉNEZ et al., 2017).

As cercarias ao penetrarem em um peixe naturalmente se encistam, estes cistos por sua vez podem variar em coloração, espessura e número de camadas de acordo com o gênero. No caso dos membros de *Uvulifer*, por exemplo, o sistema imunológico do peixe forma uma cápsula de tecido conjuntivo contendo melanóforos ao redor deste cisto, conferindo uma coloração enegrecida ao mesmo (QUIST et al., 2007). Estes cistos são encontrados principalmente nas nadadeiras, superfície corporal, brânquias, músculos e causam a popularmente conhecida “doença dos pontos pretos” (PÉREZ-PONCE DE LEÓN et al., 2007). Segundo Quist et al. (2007) os efeitos patológicos da doença variam muito podendo tanto não gerar maiores efeitos, quanto afetar o crescimento e condição corporal do hospedeiro, além de causar alta mortalidade de alevinos e grandes infecções que podem levar a morte dos hospedeiros. Esta patologia reflete em perda econômica na piscicultura devido a diminuição do

valor comercial dos peixes infectados, além da morte dos mesmos (QUIST et al., 2007; CARVALHO et al., 2008).

De acordo com Quist et al. (2007) a doença dos pontos pretos está associada não somente às espécies de *Uvulifer*, mas também por outros diplostomídeos parasitos no estágio de metacercária pertencentes aos gêneros *Crassiphiala* Van Haitsma, 1925, *Posthodiplostomum*, além de *Apophallus* Lühe, 1909 e *Cryptocotyle* Lühe, 1899 pertencentes à família Heterophyidae Leiper, 1909. Enquanto espécies de *Posthodiplostomum* são menos frequentemente associados a esta doença e a cistos enegrecidos, encontrados por vezes encistados nas vísceras, a identificação das metacercárias em cistos enegrecidos frequentemente se referem à *Uvulifer* sp. ou *U. ambloplitis*. Entretanto López-Jiménez et al. (2017) afirmaram que estes registros apresentam problemas taxonômicos por ocorrerem em ao menos 10 famílias de hospedeiros e geralmente as espécies deste gênero apresentam maior especificidade por duas famílias, Cichlidae e Peociliidae (ver Tabela 3 para mais detalhes). López-Jiménez et al. (2017) e Achatz et al. (2019b) consideram importante que os registros previamente descritos como idênticos à *U. ambloplitis* devam ser caracterizados por meio de uma abordagem integrativa utilizando dados moleculares e morfológicos para esclarecer não somente estas questões, mas outras também como taxonomia, ciclo de vida, especificidade, evolução e biogeografia.

O presente estudo tem como objetivo identificar e descrever espécimes do gênero *Posthodiplostomum* e *Uvulifer* por meio de uma abordagem integrativa, de forma a contribuir para o conhecimento da diversidade de parasitos deste grupo no Brasil. Aqui nós providenciamos descrições morfológicas junto a dados moleculares para duas espécies de *Uvulifer* e seis de *Posthodiplostomum* no Brasil, elucidando parcialmente o ciclo de vida quando possível.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Análises Filogenéticas

Todos conjuntos de iniciadores citados foram usados para amplificar os fragmentos parciais de *cox1* (ver Tabela 2 no tópico ‘Material e métodos gerais’ para detalhes sobre os iniciadores e Tabela 1 do presente capítulo para dados referentes as sequências utilizadas nas análises moleculares).

As relações intra e interespecíficas dentro de Crassiphialinae foram avaliadas em dois conjuntos de dados para *cox1*, um para iniciadores degenerados e específicos para diplostomídeos com 35 táxons, incluindo 11 sequências recém-geradas e outro com a combinação de iniciadores JB3+JB4.5/CO1-R trema com 18 táxons, sendo 14 recém-geradas. O conjunto de dados para 28S foi avaliado com 40 táxons, incluindo 18 por nós geradas. Para todos conjuntos foram utilizados como grupo externo as sequências de *Cotylurus marcogliesei* Locke, Van Dam, Caffara, Alves Pinto, Lopez-Hernández & Blanar, 2018.

As relações filogenéticas foram avaliadas usando o método de inferência Neighbor Joining (NJ) por meio do modelo de substituição de nucleotídeos Kimura 2 parâmetros implementado no programa Mega v. 7. Os valores de suporte de bootstrap foram estimados usando 1.000 pseudoreplicatas. FigTree v.1.4.2 (RAMBAUT, 2012) foi utilizado para visualizar as árvores.

**Tabela 1.** Dados referentes às espécies incluídas nas análises moleculares.

Espécie	Isolado	E	Espécie do Hospedeiro	Localidade	Número de acesso no GenBank		Referências
					cox1	28S	
<i>Bolbophorus damnificus</i>	Cb1010coi	-	-	Estados Unidos	AF470540	-	Overstreet et al. (2002)
	Lab1coi	-	-	Estados Unidos	AF470606	-	Overstreet et al. (2002)
	Lab3coi	-	-	Estados Unidos	AF470614	-	Overstreet et al. (2002)
	Lab328s	-	<i>Ictalurus punctatus</i>	Estados Unidos	-	AF470613	Overstreet et al. (2002)
	Flar1coi	-	-	Estados Unidos	AF470594	-	Overstreet et al. (2002)
	Flar3coi	-	-	Estados Unidos	AF470602	-	Overstreet et al. (2002)
	Exlar3coi	-	-	Estados Unidos	AF470590	-	Overstreet et al. (2002)
	ExAd5coi	-	-	Estados Unidos	AF470578	-	Overstreet et al. (2002)
<i>Bolbophorus</i> sp.	Cb10828s	-	-	Estados Unidos	-	AF470566	Overstreet et al. (2002)
<i>Bolbophorus</i> sp.	Cb107coi	-	-	Estados Unidos	AF470563	-	Overstreet et al. (2002)
<i>Bolbophorus</i> sp.	Cb108coi	-	-	Estados Unidos	AF470567	-	Overstreet et al. (2002)
<i>Bolbophorus</i> sp.	Cb106coi	-	-	Estados Unidos	AF470559	-	Overstreet et al. (2002)
<i>Bolbophorus</i> sp.	Lab2coi	-	-	Estados Unidos	AF470615	-	Overstreet et al. (2002)
<i>Bolbophorus</i> sp. 3	OK249	M	<i>Tilapia sparrmanii</i> Smith	Boskop, África do Sul	-	MK604822	Hoogendoorn et al. (2019)
<i>Ichthyocotylurus</i> sp.	NR-2016			Tshwane, África do Sul	-	KX034049	Moema et al. (2019)
<i>Ornithodiplostomum scardinii</i> Schulman	OSSE1	M	<i>Scardinius erythrophthalmus</i> (Linnaeus)	Lago Macha, República Tcheca	<b>KX931425</b>	KX931427	Stoyanov et al. (2017)
<i>Ornithodiplostomum</i> sp. 1	O.BR.D.P.20.1	M	<i>Perca flavescens</i> (Mitchill)	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064747</b>	-	Locke et al. (2010)
	O.BR.B.Pc.2.1	M	<i>Percina caprodes</i> (Rafinesque)	Lac Sint-Louis, Quebec, Canadá	<b>HM064735</b>	-	Locke et al. (2010)
	O.BR.B.Pc.1.3	M	<i>Percina caprodes</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064736</b>	-	Locke et al. (2010)
	O.BR.1.J.6.1	M	<i>Etheostoma nigrum</i> Rafinesque	Rio St. Lawrence, Ontario, Canadá	<b>HM064744</b>	-	Locke et al. (2010)
<i>Ornithodiplostomum</i> sp. 2	O.RH.D.G.8.1	M	<i>Notemigonus crysoleucas</i> (Mitchill)	Quebec, Canadá	<b>FJ477210</b>	-	Moszczyńska et al. (2009)
	O.BC.B.G.2.1	M	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064756</b>	-	Locke et al. (2010)
	O.LH.2.G.8.1	M	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064768</b>	-	Locke et al. (2010)
	MGC873	C	<i>Physella gyrina</i> (Say)	Canadá	<b>KT831368</b>	-	Gordy et al. (2019)
<i>Ornithodiplostomum</i> sp. 3	O.BC.B.B.8.1	M	<i>Pimephales notatus</i> (Rafinesque)	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>FJ477211</b>	-	Moszczyńska et al. (2009)
	O.BC.S.B.6.1	M	<i>Pimephales notatus</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064777</b>	-	Locke et al. (2010)
	O.IN.Lc.MEG.1.1	A	<i>Lophodytes cucullatus</i> (Linnaeus)	Lac Megantic, Quebec, Canadá	<b>MF124280</b>	-	Blasco-Costa & Locke (2017)
	O.BC.2.B.4.1	M	<i>Pimephales notatus</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064782</b>	-	Locke et al. (2010)

**Tabela 1. (continuação)**

Espécie	Isolado	E	Espécie do Hospedeiro	Localidade	Número de acesso no GenBank		Referências
					<i>cox1</i>	28S	
<i>Ornithodiplostomum</i> sp. 4	O.BR.O.B.3.1	M	<i>Pimephales notatus</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>FJ477212</b>	–	Moszczyńska et al. (2009)
	O.BR.B.8.1	M	<i>Pimephales notatus</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064785</b>	–	Locke et al. (2010)
	O.BR.B.8.6	M	<i>Pimephales notatus</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064786</b>	–	Locke et al. (2010)
<i>Ornithodiplostomum</i> sp. 8	O.BR.O.B.8.1	M	<i>Pimephales notatus</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064789</b>	–	Locke et al. (2010)
	MGC1739	C	<i>Physella gyrina</i>	Canadá	<b>KT831383</b>	–	Gordy et al. (2019)
	MGC2084	C	<i>Physella gyrina</i>	Alberta, Canadá	<b>MH368943</b>	–	Gordy et al. (2019)
<i>Posthodiplostomum brevicaudatum</i> (von Nordmann)	PBPF1	M	<i>Perca fluviatilis</i> Linnaeus	Lago Macha, República Tcheca	–	KX931426	Stoyanov et al. (2017)
<i>Posthodiplostomum centrarchi</i> Hoffman	P.Ah.MTLX.3	A	<i>Ardea herodias</i> Linnaeus	Hudson, Quebec, Canadá	MH536512	MH521251	Locke et al. (2018)
Hoffman	PD1	A	<i>Gallus gallus domesticus</i> Linnaeus	Reservatório Maconka Hungria	<b>MN179280</b>	–	Cech et al. (2020)
	PD2	A	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Reservatório Maconka Hungria	<b>MN179281</b>	–	Cech et al. (2020)
	PD4	M	<i>Lepomis gibbosus</i> (Linnaeus)	Reservatório Maconka Hungria	<b>MN179283</b>	–	Cech et al. (2020)
	PD7	M	<i>Lepomis gibbosus</i>	Reservatório Maconka Hungria	<b>MN179281</b>	–	Cech et al. (2020)
	PD10	M	<i>Lepomis gibbosus</i>	Reservatório Maconka Hungria	<b>MN179286</b>	–	Cech et al. (2020)
	PD11	M	<i>Lepomis gibbosus</i>	Reservatório Maconka Hungria	<b>MN179287</b>	–	Cech et al. (2020)
	P.Ah.MTL.X.1	A	<i>Ardea herodias</i>	Hudson, Quebec, Canadá	<b>MH581290</b>	–	Locke et al. (2018)
P.Ah.MTL.X.2	A	<i>Ardea herodias</i>	Hudson, Quebec, Canadá	<b>MH581291</b>	–	Locke et al. (2018)	
<i>Posthodiplostomum cuticola</i> (von Nordmann)	PCPP1	C	<i>Planorbis planorbis</i> (Linnaeus)	Baia Curonian, Lituânia	<b>KX931424</b>	–	Stoyanov et al. (2017)
	–	A	<i>Ardea cinerea</i> (Linnaeus)	República Tcheca	<b>MK089346</b>	–	Heneberg et al. (2020)
	PD26	M	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Hungria	<b>MN179290</b>	–	Cech et al. (2020)
<i>Posthodiplostomum nanum</i> (Dubois, 1937)	DPIC:9474	C	<i>Gundlachia ticaga</i> (Marcus & Marcus)	Belo Horizonte, Brasil	<b>MH355582</b>	–	López-Hernández et al. (2018)
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 1	P.LV.IVT.R.1F.2	M	<i>Ambloplites rupestris</i> (Rafinesque)	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064791</b>	–	Locke et al. (2010)
	P.LV.2.R.6.1	M	<i>Ambloplites rupestris</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064792</b>	–	Locke et al. (2010)
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 2	O.LV.O.S.22.1	M	<i>Lepomis gibbosus</i>	Quebec, Canadá	<b>FJ477216</b>	–	Moszczyńska et al. (2009)
	P.IN.1.S.46W.7	A	<i>Larus delawarensis</i> Ord	Rio St. Lawrence, Ontario, Canadá	<b>HM064797</b>	–	Locke et al. (2010)
	GSF251L1	M	–	Rio Ohio, Canadá	<b>MG873355</b>	–	Boone et al. (2018)
	ORS316L1	M	–	Rio Ohio, Canadá	<b>MG873359</b>	–	Boone et al. (2018)



**Tabela 1. (continuação)**

Espécie	Isolado	E	Espécie do Hospedeiro	Localidade	Número de acesso no GenBank		Referências	
					cox1	28S		
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 4	MGC2078	C	<i>Physella gyrina</i>	Alberta, Canadá	<b>MH368945</b>	–	Gordy et al. (2019)	
	P.GRI.Ah.1F.3	A	<i>Ardea herodias</i> Linnaeus	Lac Sint-Pierre, Quebec, Canadá	<b>HM064844</b>	–	Locke et al. (2010)	
	P.BC.S.B.2.1	M	<i>Pimephales notatus</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064851</b>	–	Locke et al. (2010)	
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 5	P.LM.S.S.4.1	M	<i>Lepomis gibbosus</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064857</b>	–	Locke et al. (2010)	
	P.LM.O.S.10.1	M	<i>Lepomis gibbosus</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064858</b>	–	Locke et al. (2010)	
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 7	P.RM.S.P.12.2	M	<i>Perca flavescens</i>	Quebec, Canadá	<b>FJ477221</b>	–	Moszczyńska et al. (2009)	
	P.BCM.B07.P.f.1	M	<i>Perca flavescens</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064865</b>	–	Locke et al. (2010)	
	P.RG.S.P.17.1	M	<i>Perca flavescens</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064871</b>	–	Locke et al. (2010)	
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 8	P.LV.S08.Md.3F.3	M	<i>Micropterus dolomieu</i> Lacepède	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064873</b>	–	Locke et al. (2010)	
	P.LV.S08.Md.3F.1	M	<i>Micropterus dolomieu</i>	Rio St. Lawrence, Quebec, Canadá	<b>HM064875</b>	–	Locke et al. (2010)	
	LMB255K2	M	–	Rio Ohio, Canadá	<b>MG873412</b>	–	Boone et al. (2018)	
	SPO156S1	M	–	Rio Ohio, Canadá	<b>MG873418</b>	–	Boone et al. (2018)	
	LMB189K1	M	–	Rio Ohio, Canadá	<b>MG873434</b>	–	Boone et al. (2018)	
	SPO193K2	M	–	Rio Ohio, Canadá	<b>MG873415</b>	–	Boone et al. (2018)	
	LMB189L2	M	–	Rio Ohio, Canadá	<b>MG873440</b>	–	Boone et al. (2018)	
	<i>Posthodiplostomum</i> sp. 9	OK148	M	<i>Tilapia sparrmanii</i>	África do Sul	–	MK604823	Hoogendoorn et al. (2019)
	<i>Posthodiplostomum</i> sp. 10	ExN7-16T	A	<i>Ardea cocoi</i> Linnaeus	Rio Jari, Amapá, Brasil	–	SG70	Presente estudo
		ExN7-18T	A	<i>Ardea cocoi</i>	Rio Jari, Amapá, Brasil	<b>Ge2016</b>	Ge2040	Presente estudo
ExN10-12T		M	<i>Cichla monoculus</i> Agassiz	Rio Jari, Amapá, Brasil	<b>Ge2090</b>	–	Presente estudo	
ExN7-3T		M	<i>Satanoperca jurupari</i> (Heckel)	Rio Jari, Amapá, Brasil	<b>Ge2014</b>	–	Presente estudo	
ExN10-22T		M	<i>Satanoperca jurupari</i>	Rio Jari, Amapá, Brasil	<b>Ge2012</b>	SG23	Presente estudo	
ExN10-23T		M	<i>Satanoperca jurupari</i>	Rio Jari, Amapá, Brasil	<b>Ge2013</b>	–	Presente estudo	
ExN10-24T		M	<i>Satanoperca jurupari</i>	Rio Jari, Amapá, Brasil	–	SG24	Presente estudo	
ExN10-25T		M	<i>Satanoperca jurupari</i>	Rio Jari, Amapá, Brasil	<b>Ge2091</b>	–	Presente estudo	
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 11	ExN7-21T	A	<i>Phalacrocorax brasilianus</i> (Gmelin)	Rio Jari, Amapá, Brasil	SG48	–	Presente estudo	
	ExN8-4T	A	<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	Rio Jari, Amapá, Brasil	Ge2064	SG75	Presente estudo	
	ExN8-5T	A	<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	Rio Jari, Amapá, Brasil	Ge2065	–	Presente estudo	

**Tabela 1. (continuação)**

Espécie	Isolado	E	Espécie do Hospedeiro	Localidade	Número de acesso no GenBank		Referências
					cox1	28S	
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 12	ExN8-11T	A	<i>Ardea alba</i> Linnaeus	Rio Jari, Amapá, Brasil	–	SG77	Presente estudo
	ExN9-3T	A	<i>Ardea cocoi</i>	Rio Jari, Amapá, Brasil	–	SG35	Presente estudo
	ExN11-17T	A	<i>Ardea cocoi</i>	Rio Jari, Amapá, Brasil	Ge2087	SG42	Presente estudo
	ExN7-10T	M	<i>Mesonauta acora</i> (Castelnu)	Rio Jari, Amapá, Brasil	Ge2073	–	Presente estudo
	ExN10-10T	M	<i>Mesonauta acora</i>	Rio Jari, Amapá, Brasil	Ge2083	–	Presente estudo
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 13	ExN6-3T	M	<i>Australoheros</i> sp.	Rio Guandu, Rio de Janeiro, Brasil	<b>Ge1966</b>	Ge1980	Presente estudo
	ExN9-14T	M	<i>Australoheros</i> sp.	Rio Guandu, Rio de Janeiro, Brasil	–	SG37	Presente estudo
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 14	ExN5-12T	M	<i>Crenicichla</i> sp.	Rio Jari, Amapá, Brasil	SG45	–	Presente estudo
	ExN5-13T	M	<i>Crenicichla</i> sp.	Rio Jari, Amapá, Brasil	Ge2059/ <b>Ge1962</b>	SG65	Presente estudo
	ExN7-14T	M	<i>Crenicichla</i> sp.	Rio Jari, Amapá, Brasil	<b>Ge2015</b>	SG68	Presente estudo
	ExN11-24T	M	<i>Crenicichla</i> sp.	Rio Jari, Amapá, Brasil	SG59	SG44	Presente estudo
	ExN1-6T	M	<i>Centropomus undecimalis</i> (Bloch)	Rio Guandu, Rio de Janeiro, Brasil	<b>Ge1208</b>	Ge1248	Presente estudo
	ExN2-2T	M	<i>Geophagus brasiliensis</i> (Quoy & Gaimard)	Rio Guandu, Rio de Janeiro, Brasil	<b>Ge1209</b>	Ge1218/ Ge1248	Presente estudo
	ExN11-2T	M	<i>Geophagus brasiliensis</i>	Rio Guandu, Rio de Janeiro, Brasil	SG56	–	Presente estudo
	ExN9-12T	M	<i>Geophagus brasiliensis</i>	Rio Guandu, Rio de Janeiro, Brasil	Ge2080	–	Presente estudo
<i>Posthodiplostomum</i> sp. 15	ExN11-9T	A	<i>Ardea cocoi</i>	Rio Jari, Amapá, Brasil	Ge2084	SG41	Presente estudo
	ExN3-6T	M	<i>Satanoperca pappaterra</i> (Heckel)	Rio Paraná, Paraná, Brasil	–	Ge1221	Presente estudo
	ExN8-8T	M	<i>Satanoperca jurupari</i>	Rio Jari, Amapá, Brasil	Ge2067	–	Presente estudo
	ExN11-23T	M	<i>Satanoperca jurupari</i>	Rio Paraná, Paraná, Brasil	Ge2089	–	Presente estudo
<i>Posthodiplostomum</i> sp.	1406	A	<i>Nannopterum brasilianus</i> (Gmelin)	Tabasco, México	–	MF398330	Hernández-Mena et al. (2017)
<i>Posthodiplostomum</i> sp.	VT-2013	M	<i>Channa punctatus</i> (Bloch)	Manipur, Índia	–	KF738450	Tandon
<i>Posthodiplostomum</i> sp.	NSMT	M	<i>Channa argus</i> (Bloch)	Fushinogawa, Japão	–	AB693170	Nguyen et al. (2012)
<i>Uvulifer ambloplitis</i> (Hughes)	VT1176	A	<i>Megaceryle alcyon</i>	Minnesota, Estados Unidos	<b>MK871329</b>	MK874320	Achatz et al. (2019b)
<i>Uvulifer batesi</i> Achatz, Curran, Patitucci, Fecchio & Tkach, 2019	VT4721	A	<i>Chloroceryle inda</i> (Linnaeus)	San Martin, Tocache, Peru	<b>MK871330</b>	MK874321	Achatz et al. (2019b)
<i>Uvulifer denticulatus</i> (Rudolphi, 1819)	3LF-2322	A	<i>Alcedo atthis</i> (Linnaeus)	Bartosovice, República Tcheca	MG770044	–	Heneberg et al. (2020)
	3LF-2323	A	<i>Alcedo atthis</i>	Zahlinice, República Tcheca	MG770045	–	Heneberg et al. (2020)

**Tabela 1. (continuação)**

Espécie	Isolado	E	Espécie do Hospedeiro	Localidade	Número de acesso no GenBank		Referências
					cox1	28S	
<i>Uvulifer elongatus</i> Dubois, 1988	VT6959	A	<i>Megaceryle torquata</i> (Linnaeus)	Labrea, Amazonas, Brasil	–	MK874322	Achatz et al. (2019b)
<i>Uvulifer pequenae</i> Achatz, Curran, Patitucci, Fecchio & Tkach, 2019	VT4722	A	<i>Chloroceryle inda</i>	San Martin, Tocache, Peru	<b>MK871333</b>	MK874324	Achatz et al. (2019b)
<i>Uvulifer prosocotyle</i> (Lutz)	VT6079	A	<i>Megaceryle torquata</i>	Pocone, Mato Grosso, Brasil	MK871334	MK874325	Achatz et al. (2019b)
<i>Uvulifer spinatus</i> Lopez-Jimenez, Perez-Ponce de Leon & Garcia-Varela, 2018	DNA2689	M	<i>Poecilia</i> sp.	Ro Encarnación, Guatemala	MF568674	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2695	M	<i>Alfaro huberi</i> (Fowler)	Los Potrerillos, Honduras	MF568675	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2963	A	<i>Chloroceryle americana</i> Gmelin	Rio Atlapexco, Hidalgo, México	MF568676	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2910	A	<i>Chloroceryle americana</i>	Rio Purificacion, San Luis Potosi, México	MF568677	MF568580	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2929	A	<i>Chloroceryle americana</i>	Rio Conchos, San Luis Potosi, México	MF568678	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2916	M	<i>Poecilia formosa</i> (Girard)	Puente Guemez, San Luis Potosi, México	MF568679	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2902	M	<i>Poecilia mexicana</i> Steindachner	Soto La Marina, San Luis Potosi, México	MF568681	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2909	A	<i>Chloroceryle americana</i>	Rio Purificacion, San Luis Potosi, México	MF568680	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2928	A	<i>Chloroceryle americana</i>	Rio Conchos, San Luis Potosi, México	MF568682	–	López-Jiménez et al. (2017)
<i>Uvulifer weberi</i> Dubois, 1985	VT6076	A	<i>Chloroceryle americana</i>	Pocone, Mato Grosso, Brasil	<b>MK871335</b>	MK874326	Achatz et al. (2019b)
<i>Uvulifer</i> sp. Linhagem 1	DNA2954	A	<i>Megaceryle alcyon</i> (Linnaeus)	Rio Atlapexco, Hidalgo, México	MF568659	MF568567	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2955	A	<i>Megaceryle alcyon</i>	Rio Atlapexco, Hidalgo, México	MF568660	–	López-Jiménez et al. (2017)
<i>Uvulifer</i> sp. Linhagem 2	DNA2982	M	<i>Herichthys labridens</i> (Pellegrin)	Lagoa Metztitlan, Hidalgo, México	MF568661	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2938	M	<i>Herichthys cyanoguttatus</i> Baird & Girard	Rio Frio, San Luis Potosi, Mexico	MF568662	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2973	M	<i>Herichthys labridens</i> (Pellegrin)	Lagoa Metztitlan, Hidalgo, México	MF568663	MF568570	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2983	M	<i>Herichthys labridens</i>	Lagoa Metztitlan, Hidalgo, México	MF568664	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2973	M	<i>Herichthys labridens</i> (Pellegrin)	Lagoa Metztitlan, Hidalgo, México	MF568663	MF568570	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2983	M	<i>Herichthys labridens</i>	Lagoa Metztitlan, Hidalgo, México	MF568664	–	López-Jiménez et al. (2017)

**Tabela 1. (continuação)**

Espécie	Isolado	E	Espécie do Hospedeiro	Localidade	Número de acesso no GenBank		Referências
					cox1	28S	
<i>Uvulifer</i> sp. Linhagem 2	DNA3081	M	<i>Hypsophrys</i> sp.	Palo de Arquito, Nicarágua	MF568665	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2719	M	<i>Hypsophrys nematopus</i> (Günther)	Río Orosi, Costa Rica	MF568666	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA2721	M	<i>Hypsophrys nematopus</i>	Río Orosi, Costa Rica	MF568667	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA3084	M	<i>Archocentrus centrarchus</i> (Gill)	Palo de Arquito, Nicarágua	MF568668	–	López-Jiménez et al. (2017)
<i>Uvulifer</i> sp. 2	ExN5-3	M	<i>Cichla monoculus</i> Agassiz	Rio Jari, Amapá, Brasil	Ge2007	SG32	Presente estudo
<i>Uvulifer</i> sp. Linhagem 3	DNA3044	M	<i>Amatitlania nigrofasciata</i> (Günther)	Rio Amacuzac, Morelos, México	MF568669	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA3039	M	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Morelos, México	MF568670	MF568575	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA3045	M	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Rio Amacuzac, Morelos, México	MF568671	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA3073	M	<i>Amphilophus longimanus</i> Günthe	San Carlos, Nicarágua	MF568672	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA3038	M	<i>Amatitlania nigrofasciata</i>	Huizatlan, Morelos, México	MF615998	–	López-Jiménez et al. (2017)
	DNA3066	M	<i>Amatitlania siquia</i> Schmitter-Soto	Rio Perez, Nicarágua	MF568673	–	López-Jiménez et al. (2017)
<i>Uvulifer</i> sp. 4	OK49	M	<i>Tilapia sparrmanii</i>	Rio Mooi, África do Sul	–	MK604824	Hoogendoorn et al. (2019)
<i>Uvulifer</i> sp. 4	OK324	M	<i>Tilapia sparrmanii</i>	Rio Mooi, África do Sul	<b>MK605691</b>	–	Hoogendoorn et al. (2019)
<i>Uvulifer</i> sp. 5	ExN8-1	M	<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	Rio Jari, Amapá, Brasil	Ge2062	SG73	Presente estudo
<i>Uvulifer</i> sp. 5	ExN10-19	M	<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	Rio Jari, Amapá, Brasil	SG51	SG21	Presente estudo
<i>Uvulifer</i> sp.	2081	A	<i>Megaceryle alcyon</i>	Ocotes, Oaxaca, México	–	MF398332	Hernández-Mena et al. (2017)
<i>Uvulifer</i> sp.	UMLg.ELO.2.1	M	<i>Lepomis gibbosus</i>	Ontário, Canadá	<b>MF124281</b>	–	Blasco-Costa & Locke (2017)
<i>Uvulifer</i> sp.	VT842	C	<i>Perca flavescens</i>	Bemidji, Minnesota, Estados Unidos	MK871336	MK874327	Achatz et al. (2019b)
<i>Crassiphiala</i> sp. Linhagem 1	VT1029	A	<i>Megaceryle alcyon</i>	Minnesota, Estados Unidos	<b>MN193951</b>	MN200253	Achatz et al. (2019a)
<i>Crassiphiala</i> sp. Linhagem 2	VT2173	A	<i>Megaceryle alcyon</i>	Minnesota, Estados Unidos	MN193952	MN200254	Achatz et al. (2019a)
<i>Crassiphiala</i> sp. Linhagem 3	VT906	M	<i>Perca flavescens</i>	Minnesota, Estados Unidos	<b>MN193956</b>	MN200257	Achatz et al. (2019a)
<i>Crassiphiala</i> sp. Linhagem 4	VT6080	A	<i>Megaceryle torquata</i>	Pocone, Mato Grosso, Brasil	<b>MN193958</b>	MN200260	Achatz et al. (2019a)
<i>Crassiphiala</i> sp. Linhagem 5	VT6078	A	<i>Megaceryle torquata</i>	Pocone, Mato Grosso, Brasil	MN193959	–	Achatz et al. (2019a)
	VT6081	A	<i>Megaceryle torquata</i>	Pocone, Mato Grosso, Brasil	–	MN200261	Achatz et al. (2019a)

**Tabela 1. (continuação)**

Espécie	Isolado	E	Espécie do Hospedeiro	Localidade	Número de acesso no GenBank		Referências
					<i>cox1</i>	28S	
<i>Cardiocephaloides medioconiger</i> (Dubois & Perez-Vigueras)	C.IN.FKY.Tm.31 15.1	A	<i>Thalasseus maximus</i> (Boddaert)	Florida, Estados Unidos	–	MH521247	Locke et al. (2018)
<i>Cotylurus marcogliesei</i> Locke, Van Dam, Caffara, Pinto, Lopez-Hernández & Blanar, 2018	S.IN.Lc.MTL.2.5	A	<i>Lophodytes cucullatus</i> (Linnaeus)	Hudson, Canadá	MH536509	MH521248	Locke et al. (2018)
Diplostomidae gen. sp.	OK141	M	<i>Tilapia sparrmanii</i>	Rio Vaal, África do Sul	<b>MK605692</b>	MK604826	Hoogendoorn et al. (2019)

Em negrito estão as sequências amplificadas com iniciadores degenerados e específicos para diplostomídeos. *Abreviações*: \*E, Estágio do ciclo de vida, A, adulto; M, metacercária; MS, mesocercária; PM, metacercária progenética; C, cercária

### 4.3 RESULTADOS

Apesar da ampla área de coleta e da vasta diversidade de hospedeiros por nós analisados, os representantes do gênero *Uvulifer* somente foram identificados no rio Jari, Amapá em dois hospedeiros, isto é, *Cichla monoculus* Agassiz (Cichlidae Bonaparte) e *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin) (Ave: Suliformes). No que se refere ao *Posthodiplostomum*, as espécies aqui analisadas foram coletadas no rio Guandu, Rio de Janeiro; rio Paraná e principalmente no rio Jari, Amapá. Assim como grande parte dos registros de metacercárias deste gênero, os espécimes aqui analisados foram coletados em ciclídeos. No presente estudo os espécimes de *Posthodiplostomum* foram coletados em um total de oito espécies de peixes, compreendendo duas famílias da ordem Cichliformes, isto é, Cichlidae: *Australoheros* sp., *Cichla monoculus* Agassiz, *Crenicichla* sp., *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard), *Mesonauta acora* (Castelnau), *Satanoperca jurupari* (Heckel), *Satanoperca pappaterra* (Heckel); Centropomidae: *Centropomus undecimalis* (Bloch). Os espécimes adultos de *Posthodiplostomum* foram coletados em aves de duas ordens, isto é, Pelicaniformes: *Ardea alba* Linnaeus e *Ardea cocoi* Linnaeus (Ardeidae); Suliformes: *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin) (Phalacrocoracidae) (ver Tabela 1 para hospedeiros e localidades).

Todas espécies aqui descritas seguem numeração subsequente à utilizada por estudos prévios publicados (LOCKE et al., 2010b; LÓPEZ-JIMÉNEZ et al., 2017; HOOGENDOORN et al. 2019).

#### 4.3.1 Dados moleculares

Sequências parciais de *cox1* e 28S rDNA (D1-D3 domínio) foram geradas para 3 espécimes de *Uvulifer* spp. e 30 espécimes de *Posthodiplostomum* spp. Quanto ao gênero *Uvulifer*, estes dados se referem a uma metacercária obtida de peixe como hospedeiros intermediários e duas metacercárias obtidas em ave como hospedeiro acidental (*Phalacrocorax brasilianus*). Para *Posthodiplostomum* se referem à 21 metacercárias obtidas de peixes como hospedeiros intermediários e 9 espécimes adultos obtidos de diferentes espécies de aves como hospedeiros adultos. As sequências obtidas para *cox1* apresentaram o comprimento de 392–431 pb e as sequências obtidas para 28S rDNA apresentaram o comprimento de 1.302–1.321 pb. O uso de iniciadores diferentes para o gene *cox1*, ainda que referentes a diferentes regiões gênicas, nos permitiu amplificar o material genético para todas espécies aqui propostas. A única espécie com amplificação bem-sucedida para ambas regiões de *cox1* foi *Posthodiplostomum* sp. 14.

Para ambas espécies de *Uvulifer* somente obtivemos sucesso na amplificação do DNA com os iniciadores JB3+JB4.5/CO1-R trema. Por outro lado, o material genético para todas espécies aqui analisadas foi amplificado para o gene 28S rDNA.

#### 4.3.2 Relações entre membros Crassiphialinae

A subfamília Crassiphialinae foi identificada em dois subclados monofiléticos assim como sugerido por Achatz et al. (2019a), isto é, (i) um clado composto pelos gêneros parasitários *Uvulifer* + *Crassiphiala* (clado 1) e (ii) um clado composto por *Bolbophorus* + *Posthodiplostomum* + *Ornithodiplostomum* (clado 2).

Em todas análises realizadas no presente estudo, os espécimes aqui identificados como *Posthodiplostomum* foram recuperados em um clado irmão aos outros membros do gênero previamente identificados. Somente em análise de 28S (Figura 1) uma sequência agrupou com as espécies por nós identificadas, esta referente a metacercária proveniente da África do Sul identificada como *Posthodiplostomum* sp. 9 por Hoogendoorn et al. (2019). Agrupada com *Posthodiplostomum* sp. 11, ambas diferiram em 0,4% (5 pb). Dentre as espécies aqui descritas dois grupos irmãos com alto suporte foram recuperados: (i) *Posthodiplostomum* sp. 10 + *Posthodiplostomum* sp. 11 e (ii) *Posthodiplostomum* sp. 12 + *Posthodiplostomum* sp. 13 + *Posthodiplostomum* sp. 14 + *Posthodiplostomum* sp. 15.

As comparações das sequências de 28S entre os isolados recém-sequenciados são fornecidas na tabela 2 e demonstraram que a divergência interespecífica para o gênero *Posthodiplostomum* variou entre 0,2–7,9% (3–95 pb) e entre *Uvulifer* spp 1,4% (18 pb). Não foi detectada divergência intraespecífica para nenhuma das espécies apresentadas, isto é, sequências idênticas compartilhadas entre: (i) os dois isolados adultos de *Posthodiplostomum* sp. 10 coletados em *A. cocoi* e os dois isolados de metacercárias em *C. monoculus* e *S. jurupari*; (ii) os dois isolados adultos de *Posthodiplostomum* sp. 12 coletado em *A. cocoi*, um isolado em *A. alba* e os dois isolados de metacercárias em *M. acora*; (iii) os dois isolados de metacercárias de *Posthodiplostomum* sp. 13 em *Australoheros* sp.; (iv) os sete isolados de metacercárias de *Posthodiplostomum* sp. 14 em *Crenicichla* sp., *C. undecimalis* e *G. brasiliensis*; (v) o isolado adulto de *Posthodiplostomum* sp. 15 coletado em *A. cocoi* e os três isolados de metacercárias em *S. jurupari* e *S. papatera*; (vi) os dois isolados de metacercárias de *Uvulifer* sp. 5 em *Phalacrocorax brasilianus*.

**Tabela 2.** Divergência genética média (distância p não corrigida em%) estimada para sequências *cox1* parciais intraespecíficas (diagonal, negrito) e interespecíficas para Proterodiplostomidae (abaixo da diagonal). As diferenças totais em pares de base entre as sequências 28S rDNA são fornecidas acima da diagonal.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 10	<b><u>0,3–0,7</u></b>	6	<b>9</b>	18	16	17	86	82
2 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 11	–	0,5–1,5	13	16	14	15	84	80
3 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 12	–	14,9–16,2	0,8–2,8	13	11	10	87	81
4 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 13	<u>12,7–13,7</u>	–	–	–	9	7	86	80
5 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 14	<u>12,6–13,4</u>	15,4–16,4	15,2–15,9	–	<b>0–0,8</b>	3	89	83
6 <i>Posthodiplostomum</i> sp. 15	–	13,4–13,9	13,9–14,4	–	9,6–10,4	–	88	77
7 <i>Uvulifer</i> sp. 2	–	20,7–21,3	20,2–21,7	–	17,7–18,3	18,8–19,1	–	18
8 <i>Uvulifer</i> sp. 5	–	21,2–21,7	21–21,5	–	18,7–19,7	17,4–18,2	10,9	<b>0,8</b>

\*Valores sublinhados referem-se à região *cox1* amplificada com a combinação de iniciadores degenerados e específicos para diplostomídeos

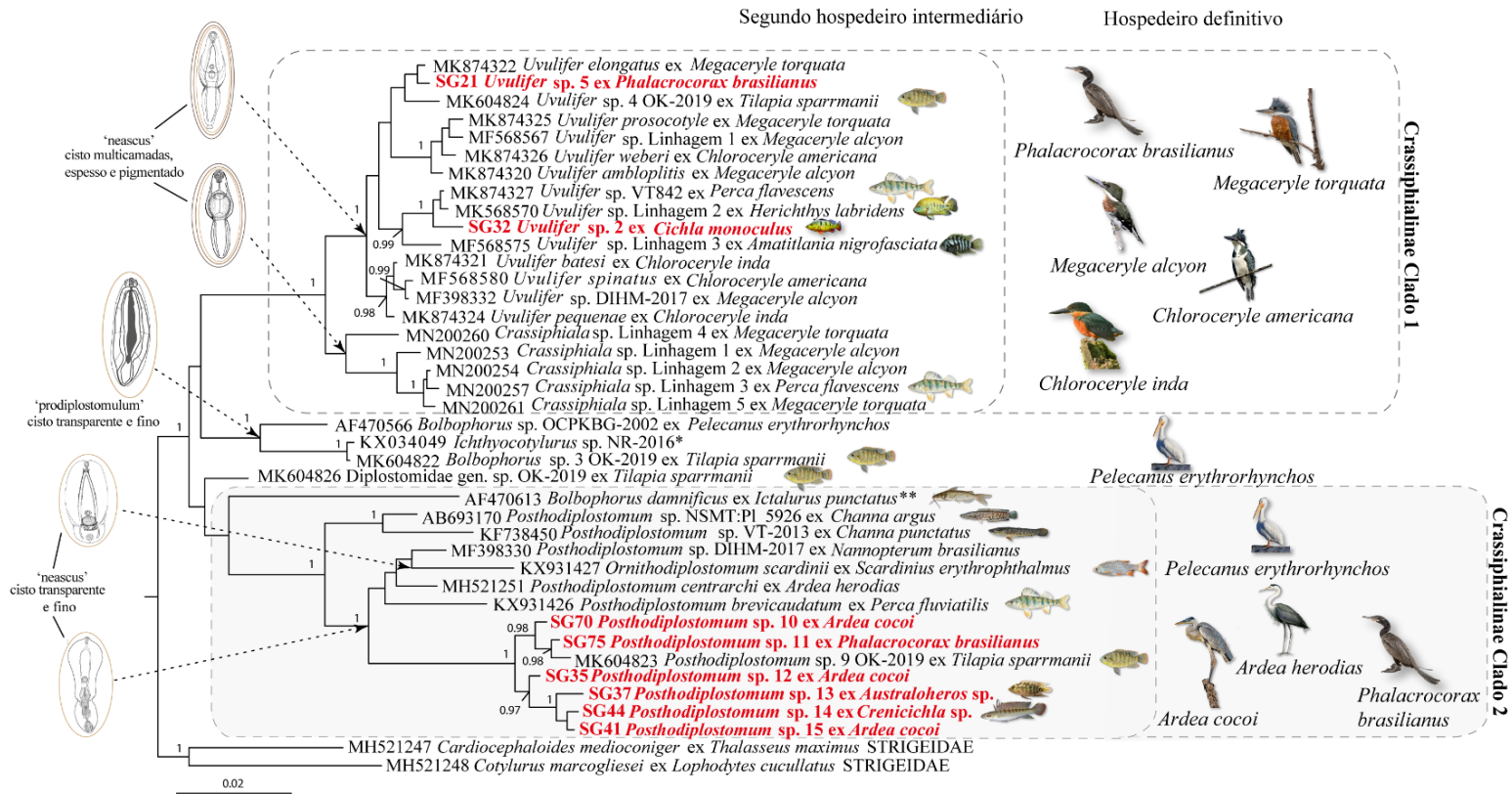
No que se refere ao gênero *Uvulifer*, as espécies aqui analisadas apresentaram-se em clados distintos. Mediante análise molecular consideramos que a espécie aqui identificada como *Uvulifer* sp. 2 se refere a espécie identificada como *Uvulifer* sp. Linhagem 2 por López-Jiménez et al. (2017) oriunda do México. O presente espécime apresentou alta similaridade com *Uvulifer* sp. Linhagem 2, isto é, ambas espécies foram identificadas agrupadas em um único clado, diferindo em análise de *cox1* por 0,8% de divergência genética ou 3 pb em espécimes oriundos do México. Quanto a espécimes da Nicarágua e Costa Rica, a divergência genética alcançou 2,7%, que representam 10 pb. As sequências referentes a *Uvulifer* sp. Linhagem 2, em seu artigo original, formaram dois clados distintos quanto ao gene *cox1*, um com espécimes oriundos unicamente do México e outro formado por espécimes da Costa Rica e Nicarágua agrupados, apesar desta distinção apenas espécimes oriundos do México foram amplificados para o gene 28S, além de nenhum dado morfológico fornecido, fatores estes que impedem maiores comparações. Apesar dos valores não serem o suficiente para diferenciá-los em espécies diferentes, torna-se nítida uma distinção entre ambas populações.

Em análise de 28S, podemos identificar na árvore filogenética que *Uvulifer elongatus* Dubois, 1988 foi a espécie com maior proximidade à *Uvulifer* sp. 5. Verificamos que ambas diferiram em três pares de base e 0,25% de divergência genética, valores estes condizentes com a variabilidade interespecífica entre 0,1–2,2% (1-25 pb) relatada por Achatz et al. (2019b). A sequência genética disponível para esta espécie referente ao gene *cox1* corresponde a região distinta da por nós amplificada impedindo maiores comparações.

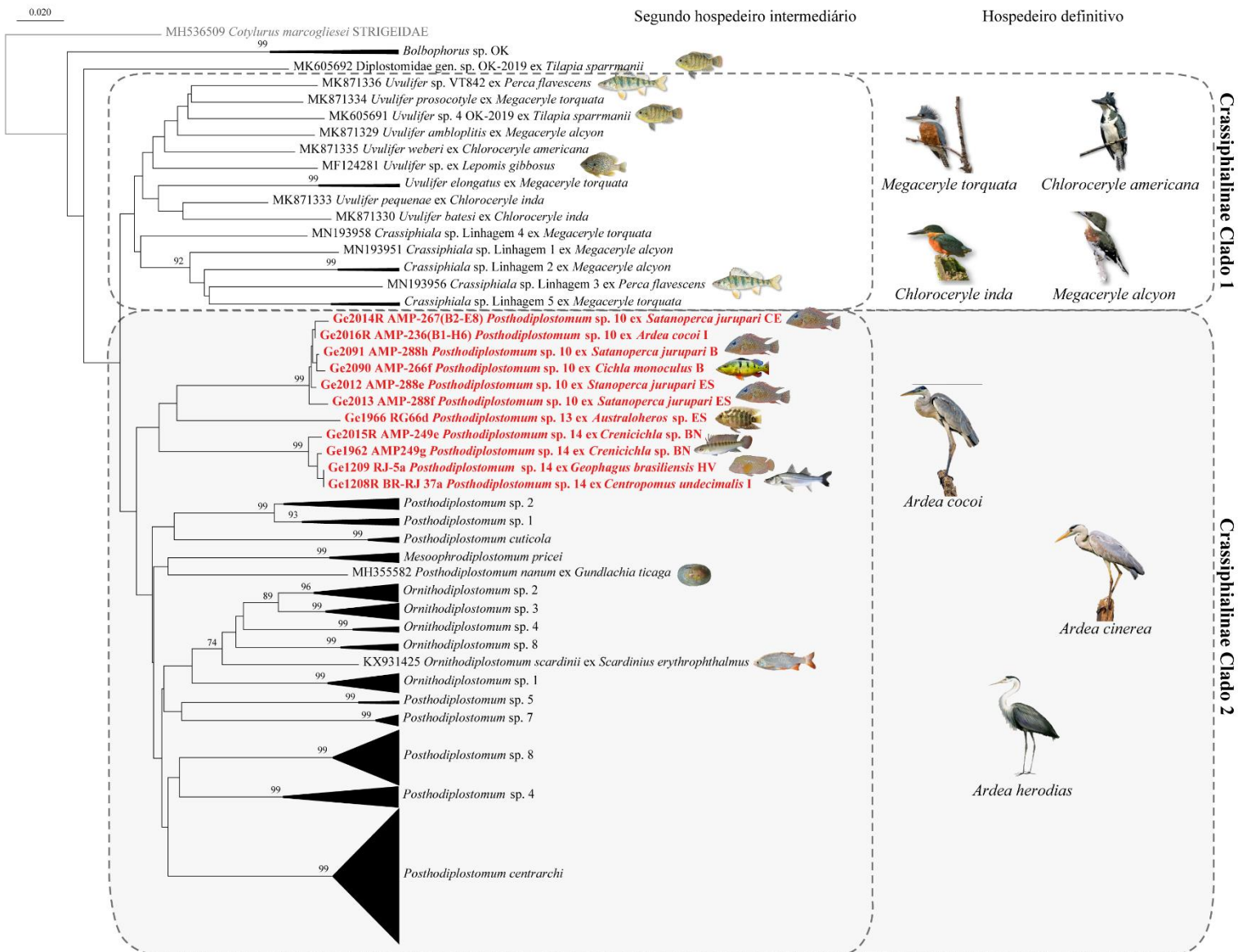
Dentre o gênero *Uvulifer*, a divergência interespecífica para *cox1* no presente estudo variou entre 3,9–15,9%, sendo entre 10,4–10,9% a divergência entre as espécies aqui descritas,



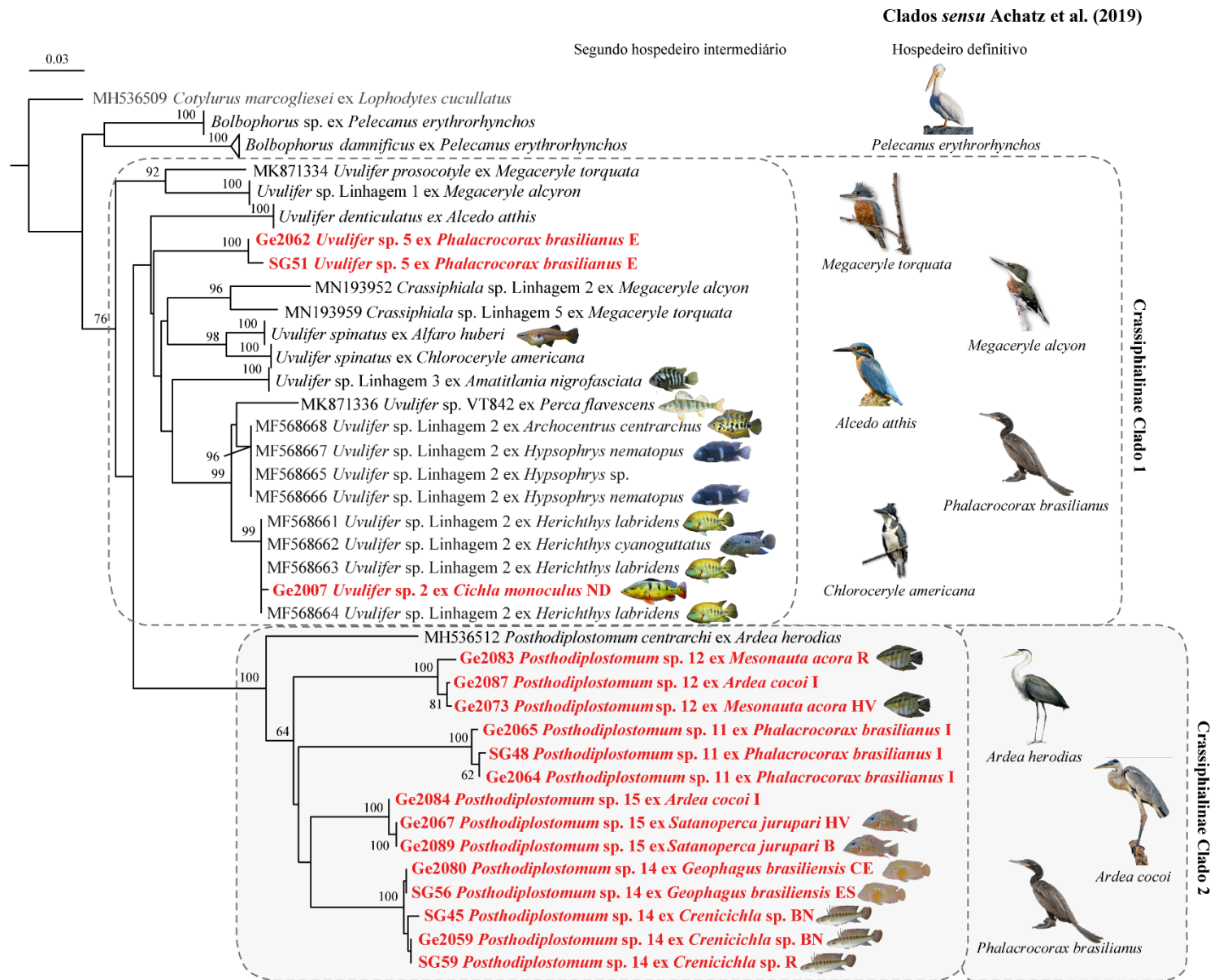
taxas estas condizentes com as apresentadas por López-Jiménez et al. (2017) que identificaram uma variabilidade genética entre 9,3–12,5% para todas espécies por eles sequenciados e entre 9,3–15,1% por Achatz et al. (2019b).



**Figura 1.** Análise filogenética do gene 28S rDNA para membros da subfamília Crassiphialinae. Clados identificados de acordo com Achatz et al. (2019). Os suportes nodais são dados acima dos ramos, as probabilidades de valores inferiores a 0.90 foram suprimidos.



**Figura 2.** Análise filogenética do gene *cox1* mtDNA com sequências amplificadas com os iniciadores MplatCOX1dF + MplatCOX1dR e Plat-diploCOX1F + Plat-diploCOX1R para membros da subfamília Crassiphialinae. Clados identificados de acordo com Achatz et al. (2019). Os suportes nodais são dados acima dos ramos, as probabilidades de valores inferiores a 0.90 foram suprimidos. Siglas: B, brânquias; BN, bexiga natatória; CE, cérebro; ES, esclera; HV, humor vítreo; I, intestino.



**Figura 3.** Análise filogenética do gene *cox1* mtDNA com sequências amplificadas com os iniciadores JB3 + JB4.5/CO1-R trema para membros da subfamília Crassiphialinae. Clados identificados de acordo com Achatz et al. (2019). Os suportes nodais são dados acima dos ramos, as probabilidades de valores inferiores a 0.90 foram suprimidos. Siglas: B, brânquias; BN, bexiga natatória; CE, cérebro; ES, esclera; E, estômago; HV, humor vítreo; I, intestino; ND, nadadeira; R, retina.

### 4.3.3 Descrição das espécies e sumário taxonômico

Classe Trematoda Rudolphi, 1808

Subclasse Digenea Carus, 1863

Ordem Diplostomida Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003

Subordem Diplostomata Olson, Cribb, Tkach, Bray & Littlewood, 2003

Superfamília Diplostomoidea Poirier, 1886

Família Diplostomidae Poirier, 1886

Subfamília Crassiphialinae Sudarikov, 1960

Gênero *Posthodiplostomum* Dubois, 1936

#### 4.3.3.1 *Posthodiplostomum* sp. 10

*Descrição* (Figura 4 A, B)

*Adulto* [baseada em espécimes coletados em *Ardea cocoi*, localidade: rio Jari, Amapá; 2 espécimes fixados em água quente, medidas na Tabela 3].

Corpo distintamente bipartido. Segmento anterior oval com concavidade ventral. Segmento posterior cilíndrico. Ventosa oral subsférica, subterminal. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral ligeiramente oval. Órgão tribocítico subsférico com abertura longitudinal tipo fenda trilobada, localizado próximo à margem posterior do segmento anterior. Testículo anterior oval, testículo posterior assimétrico. Ovário subsférico ao lado do testículo anterior. Vitelária ocupa um terço do segmento anterior estendendo-se ao segmento posterior, ultrapassando o testículo posterior. Bolsa copulatória evaginada com abertura terminal. Prepúcio envolvendo o cone genital.

*Metacercária* [baseada em espécimes coletados em *Satanoperca jurupari*, localidade: rio Jari, Amapá; 6 espécimes fixados em água quente, medidas na Tabela 4].

Corpo distintamente bipartido. Segmento anterior espatulado com concavidade ventral, coberto com numerosos pequenos espinhos. Segmento posterior em forma de bulbo. Ventosa oral pequena, oval, terminal. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral subsférica, mais larga que ventosa oral. Pré-faringe presente. Faringe alongada. Esôfago curto e afilado. Ceco longo, afilado, terminando cego posteriormente ao testículo posterior. Órgão tribocítico subsférico com abertura longitudinal tipo fenda, localizado próximo à margem posterior do segmento anterior. Glândula proteolítica bipartida, situada à margem posterior do órgão tribocítico. Dois

testículos primordiais, lobados, testículo anterior menor que o posterior, testículo posterior mais longo com metade anterior mais larga estreitando-se posteriormente. Ovário primordial subsférico, lateral. Bolsa copulatória evaginada. Poro genital terminal. Sistema excretor tipo ‘*neascus*’, composto por um canal mediano ramificado e dois canais laterais de cada lado formando rede no segmento anterior; canais mais laterais com numerosas anastomoses. Concreções excretoras pequenas, livres nos canais do segmento anterior, denso.

#### *Sumário taxonômico*

*Hospedeiro definitivo: Ardea cocoi* Linnaeus (Pelicaniformes: Ardeidae).

*Segundo hospedeiro intermediário: Cichla monoculus* Agassiz (Cichliformes: Cichlidae);

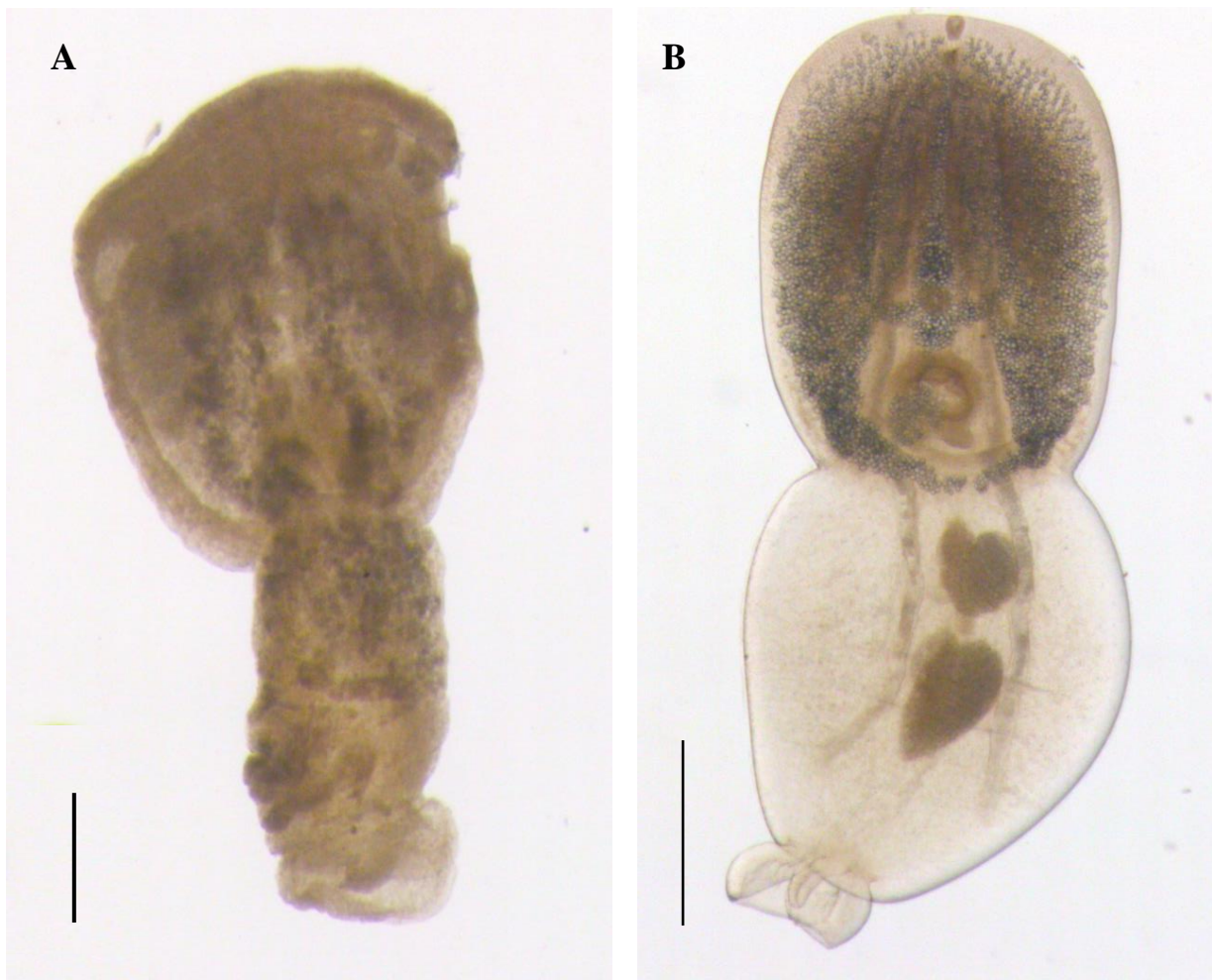
*Satanoperca jurupari* (Heckel) (Cichliformes: Cichlidae).

*Sítio de infecção no hospedeiro: brânquias (Cichla monoculus); brânquias, cérebro, esclera e cavidade corporal (Satanoperca jurupari).*

*Localidade: rio Jari, Amapá (1°07'31.6"S, 51°59'38.8"W).*

#### *Comentários*

Os espécimes adultos recuperados de *Posthodiplostomum* concordam bem com o diagnóstico do gênero de acordo com Niewiadomska (2002c), isto é, corpo distintamente bipartido, ausência de pseudoventosas, vitelária presente em ambos segmentos do corpo, testículos assimétricos, bolsa copuladora evaginável e cone genital envolvido pelo prepúcio. A identificação de metacercárias foi possibilitada pela correspondência entre as sequências, permitindo uma elucidação parcial do seu ciclo de vida. As sequências apresentaram a diferença nucleotídica entre 1 e 3 pb na região *cox1* parcial sequenciada. Os espécimes adultos aqui analisados distinguem morfológicamente dos outros membros do gênero pelo segmento anterior e posterior de tamanhos proporcionalmente similares, isto é, relação entre comprimento do segmento anterior e o segmento posterior entre 1:1 e 1:0,8; pelo segmento anterior ovalado e segmento posterior subcilíndrico, além da vitelária ultrapassar a ventosa ventral.



**Figura 4.** Fotomicrografia de espécimes de *Posthodiplostomum* sp. 10. **A.** Espécime adulto coletado em *Ardea cocoi* Linnaeus, vista ventral; **B.** Espécime em estágio de metacercária coletado em *Cichla monocolus* Agassiz. Barra de escala: A-200  $\mu$ m, B-500  $\mu$ m.

**Tabela 3.** Dados morfométricos comparativos entre adultos do gênero *Posthodiplostomum* relatados no Brasil.

<b>Espécie</b>	<b><i>Posthodiplostomum</i> sp. 10</b>	<b><i>Posthodiplostomum</i> sp. 11</b>	<b><i>Posthodiplostomum</i> sp. 12</b>	<b><i>Posthodiplostomum</i> sp. 15</b>
<b>Hospedeiro</b>	<i>Ardea cocoi</i> Linnaeus	<i>Phalacrocorax brasilianus</i> (Gmelin)	<i>Ardea alba</i> Linnaeus, <i>Ardea cocoi</i>	<i>Ardea cocoi</i>
<b>Localidade</b>	Rio Jari, Amapá	Rio Jari, Amapá	Rio Jari, Amapá	Rio Jari, Amapá
<b>Referência</b>	Presente estudo	Presente estudo	Presente estudo	Presente estudo
<b>Tamanho amostral</b>	<i>n</i> = 2	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 1
CT	1252–1337	655–952	499–750	871
CSA	624–778	533–647	328–544	493
LSA	465–615	398–468	236–364	369
CSP	632	209–327	192–349	412
LSP	301–320	257–281	161–227	203
CVO	66–86	55–59	30–46	56
LVO	65–93	46–66	36–50	74
CVV	77–84	56–73	39–44	112
LVV	72–80	74–78	47–54	132
CPF	–	11	3–4	5
CF	–	35–56	30–35	57
LF	–	34–55	20–36	49
LE	–	41	15–21	34
CE	–	–	10–12	–
COT	157–205	107–150	66–108	138
LOT	145–199	116–147	81–140	132
CO	74	26–56	32–38	91
LO	72	24–67	28–37	92
CTA (D)	104–126	24–52	35–55	111
LTA (D)	99–114	22–74	35–53	85
CTA (E)	–	28–54	–	–
LTA (E)	–	26–68	–	–
CTP (D)	95–115	197–205	83–106	103
LTP (D)	110–138	80–102	45–46	70
CTP (E)	–	188–202	31–104	–
LTP (E)	–	77–118	41–48	–
CBC	139	119	74–90	243
LBC	282	132	91–98	172
COV	–	–	67–70	92–80
LOV	–	–	50–55	56–62
DVVAC	–	153–387	143–344	284
DVVPSA	293–386	198–344	106–197	152
DOTVV	22–32	11–53	17–20	21

**Tabela 3. (continuação)**

<b>Espécie</b>	<b><i>Posthodiplostomum grande</i> (Diesing) Dubois, 1936</b>	<b><i>Posthodiplostomum macrocotyle</i> Dubois, 1937</b>	<b><i>Posthodiplostomum microsicya</i> Dubois, 1936</b>	<b><i>Posthodiplostomum nanum</i> Dubois, 1937</b>
<b>Hospedeiro</b>	<i>Agamia agami</i> (Gmelin)	<i>Rhynchops nigra</i> Linnaeus	<i>Botaurus pinnatus</i> (Wagler)	<i>Butorides striata</i> (Linnaeus)
<b>Localidade</b>	Mato Grosso	Brasil	Brasil	Brasil
<b>Referência</b>	Dubois, 1938	Dubois, 1938	Dubois, 1938	Dubois, 1938
<b>Tamanho amostral</b>	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado
CT	1620–2250	890–1170	1630–1950	420–590
CSA	960–1560	540–750	1100–1400	250–360
LSA	1080–1813	230–290	350–380	140–290
CSP	720–930	350–450	530–570	160–260
LSP	250–450	200–290	220–240	90–160
CVO	55–75	24–34	18	26–34
LVO	55–83	25–36	18	24–29
CVV	82–100	60–64	40	24–36
LVV	95–105	70–77	53–54	30–40
CPF	–	–	–	–
CF	65–75	25–34	23–29	24–33
LF	45–65	19–28	15–18	18–25
LE	–	–	–	–
CE	–	–	–	–
COT	260–400	120–160	200–230	43–76
LOT	260–405	105–135	120–150	60–96
CO	170	46–50	72	24–31
LO	100	62–65	90	29–45
CTA	160–230	75–145	145–160	45–72
LTA	170–275	100–175	180	55–84
CTP	–	120–215	215–220	55–72
LTP	–	145–260	210	82–130
CBC	230–280	90–108	100	60–80
LBC	155–225	100–125	100	60–75
COV	70–86	77–89	60–72	62–76
LOV	45–55	55–57	38–45	42–48
DVVPSA	–	–	–	–
DOTVV	–	–	–	–
DVVPSA	–	–	–	–



**Tabela 4.** Dados morfológicos comparativos entre metacercárias do gênero *Posthodiplostomum* relatados no Brasil.

<b>Espécie</b>	<i>Posthodiplostomum</i> sp. 10	<i>Posthodiplostomum</i> sp. 12	<i>Posthodiplostomum</i> sp. 13	<i>Posthodiplostomum</i> sp. 15
<b>Hospedeiro</b>	<i>Cichla monoculus</i> Agassiz; <i>Satanoperca jurupari</i> (Heckel)	<i>Mesonauta acora</i> (Castelnau)	<i>Australoheros</i> sp.	<i>Satanoperca jurupari</i> ; <i>Satanoperca pappaterra</i> (Heckel)
<b>Localidade</b>	Rio Jari, Amapá	Rio Jari, Amapá	Rio Jari, Amapá	Rio Jari, Amapá; rio Paraná
<b>Referência</b>	Presente estudo	Presente estudo	Presente estudo	Presente estudo
<b>Tamanho amostral</b>	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 2	<i>n</i> = 2	<i>n</i> = 3
CT	1076–2513	545–743	6084–7154	1212–1803
CSA	635–1319	401–491	5351–5581	870–1256
LSA	494–1031	375–401	2318–2656	618–772
CSP	477–1286	220–304	1176–2308	404–632
LSP	530–977	279–350	1365–1790	496–555
CVO	55–85	45–50	64–158	77–92
LVO	37–79	31–32	136–146	65–73
CVV	82–88	51–57	294–309	100–135
LVV	86–107	45–46	252–329	111–152
CPF	5–12	13–15	–	14
CF	52–64	34–41	67–120	46–61
LF	36–42	21–24	79–123	38–46
CE	33–65	15–21	147–300	7–45
LE	8–13	9	81	14–20
COT	105–221	32–48	944–1250	128–166
LOT	107–264	44–47	871–955	121–209
COTG	–	87	–	141–235
LOTG	–	89	–	160–212
CO	44–198	45	142–174	57–78
LO	53–138	59	133–161	60–87
CTA (D)	104–232	40–49	227–285	73–87
LTA (D)	104–227	50–56	186–295	80–102
CTA (E)	–	–	–	79–146
LTA (E)	–	–	–	68–164
CTP (D)	119–332	34–82	219–601	194–255
LTP (D)	122–208	38	142–224	94–123
CTP (E)	201–369	–	241–590	201–272
LTP (E)	181–224	–	193–202	71–136
CBC	198–315	71–76	396–465	148–230
LBC	245–354	71–99	491–541	140–180
DVVAC	538–745	190–291	2352–2612	441–757
DVVPSA	441–500	144–152	2500–2745	262–410
DOTVV	29–62	28	424–704	8–72

**Tabela 4. (continuação)**

<b>Espécie</b>	<b><i>Posthodiplostomum</i> sp. 14</b>	<b><i>Posthodiplostomum</i> sp. 1</b>	<b><i>Posthodiplostomum</i> sp. 2</b>	<b><i>Posthodiplostomum nanum</i></b>
<b>Hospedeiro</b>	<i>Crenicichla</i> sp.; <i>Centropomus undecimalis</i> (Bloch); <i>Geophagus brasiliensis</i> (Quoy & Gaimard)	<i>Geophagus brasiliensis</i>	<i>Geophagus brasiliensis</i>	<i>Poecilia reticulata</i> Peters
<b>Localidade</b>	Rio Jari; rio Guandu, Rio de Janeiro	Rio Guandu, Rio de Janeiro	Rio Guandu, Rio de Janeiro	Represa Pampulha, Minas Gerais
<b>Referência</b>	Presente estudo	Carvalho et al. (2012)	Carvalho et al. (2012)	Pinto et al. (2012a)
<b>Tamanho amostral</b>	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 6	Não informado
CT	1604–2803	1534–2011	719–758	911–1117
CSA	1022–1679	–	–	447–516
LSA	654–840	432–605	417–428	–
CSP	612–1288	552–799	294–305	–
LSP	459–744	422–556	224–258	–
CVO	65–107	60–78	59–65	38–51
LVO	58–93	43–58	52–58	34–43
CVV	97–143	78–100	65–73	43–77
LVV	89–128	73–95	79–87	48–77
CPF	10–20	–	–	–
CF	45–73	35–46	28–34	–
LF	39–52	32–41	19–22	–
CE	22–164	–	–	–
LE	13–15	–	–	–
COT	130–258	157–199	134–152	150–205
LOT	88–221	148–192	131–140	157–205
COTG	175–201	–	–	–
LOTG	216–229	–	–	–
CO	45–127	51–64	47–53	–
LO	53–93	40–53	46–50	–
CTA (D)	99–196	158–204	130–149	–
LTA (D)	69–196	208–279	158–177	–
CTA (E)	193–301	–	–	–
LTA (E)	100–178	–	–	–
CTP (D)	207–523	253–327	220–244	–
LTP (D)	73–173	252–314	231–256	–
CTP (E)	234–482	–	–	–
LTP (E)	68–162	–	–	–
CBC	143–261	153–219	164–186	–
LBC	147–222	152–203	154–170	–
DVVAC	556–988	–	–	–
DVVPSA	363–562	–	–	–
DOTVV	28–160	–	–	–

#### 4.3.3.2 *Posthodiplostomum* sp. 11

*Descrição* (Figura 5)

*Adulto* [baseada em espécimes coletados em *Phalacrocorax brasilianus*, localidade: rio Jari, Amapá; 3 espécimes fixados em água quente, medidas na Tabela 3].

Corpo distintamente bipartido. Segmento anterior espatulado com concavidade ventral. Segmento posterior com forma de bulbo. Ventosa oral subsférica, terminal. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral subsférica. Pré-faringe ausente ou indistinta. Faringe subsférica. Órgão tribocítico subsférico com abertura longitudinal tipo fenda, localizado próximo à margem posterior do segmento anterior. Testículo anterior lobado, menor que testículo posterior. Testículo posterior bifurcado em forma de V. Ovário subsférico ao lado do testículo anterior. Vitelária ultrapassa a ventosa ventral. Bolsa copulatória com abertura subterminal. Sistema excretor do tipo ‘*neascus*’ identificado somente na região anterior do corpo com um ramo mediano e dois laterais de cada lado.

*Sumário taxonômico*

*Hospedeiro definitivo*: *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin) (Suliformes: Suliformes).

*Sítio de infecção no hospedeiro*: intestino (*Phalacrocorax brasilianus*).

*Localidade*: rio Jari, Amapá (1°07'31.6"S, 51°59'38.8"W).

*Comentários*

A presente espécie, assim como *Posthodiplostomum obesum* (Lutz, 1928), foi coletada de *Phalacrocorax brasilianus*, entretanto ambas diferem pelo testículo posterior bifurcado em *Posthodiplostomum* sp. 11 (vs lobados assimétrico em *P. obesum*), faringe menor que ventosa oral (vs faringe e ventosa oral de comprimento similares), relação entre o comprimento da ventosa ventral e do órgão tribocítico de 1:2 (vs relação de 1:3,5 em *P. obesum*). Não há sequências genéticas referentes a *P. obesum* que permitam maiores comparações.



**Figura 5.** Fotomicrografia de metacercaria de *Posthodiplostomum* sp. 11 coletado em *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin), vista ventral. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

#### 4.3.3.3 *Posthodiplostomum* sp. 12

*Descrição* (Figura 6 A, B)

*Adulto* [baseada em espécimes coletados em *Ardea cocoi*, localidade: rio Jari, Amapá; 3 espécimes fixados em água quente, medidas na Tabela 3].

Corpo distintamente bipartido. Segmento anterior oval com concavidade ventral, maior que segmento posterior. Segmento posterior em forma de bulbo. Ventosa oral ligeiramente oval, terminal. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral subsférica. Pré-faringe presente. Faringe alongada. Órgão tribocítico oval com abertura longitudinal tipo fenda, localizado próximo à margem posterior do segmento anterior. Testículo anterior lobado, menor que testículo posterior. Testículo posterior lobado. Ovário oval ao lado do testículo anterior. Bolsa copulatória evaginada com abertura terminal. Ovos grandes, não filamentados. Sistema excretor

do tipo '*neascus*' identificado somente na região anterior do corpo com um ramo mediano e dois laterais de cada lado.

*Metacercária* [baseada em espécimes coletados em *Mesonauta acora*, localidade: rio Jari, Amapá; 2 espécimes fixados em água quente, medidas na Tabela 2]

Cisto grande, parede fina, transparente. Corpo distintamente bipartido. Segmento anterior espatulado, com concavidade ventral. Segmento posterior em forma de bulbo. Ventosa oral oval, alongada, terminal. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral oval, maior que ventosa oral. Pré-faringe presente. Faringe alongada. Esôfago curto e afilado. Ceco longo, afilado, terminando cego próximo a bolsa copulatória.

Órgão tribocítico subsférico com abertura longitudinal tipo fenda, localizado próximo à margem posterior do segmento anterior. Dois testículos primordiais ovais. Ovário primordial oval. Bolsa copulatória com abertura terminal. Poro genital terminal.

Sistema excretor tipo '*neascus*', composto por um canal mediano ramificado e dois canais laterais de cada lado formando rede no segmento anterior; canais mais laterais com numerosas anastomoses. Concreções excretoras pequenas, livres, denso nos canais do segmento anterior.

#### *Sumário taxonômico*

*Hospedeiro definitivo: Ardea alba* Linnaeus, *Ardea cocoi* Linnaeus (Pelicaniformes: Ardeidae).

*Segundo hospedeiro intermediário: Mesonauta acora* (Castelnau) (Cichliformes: Cichlidae).

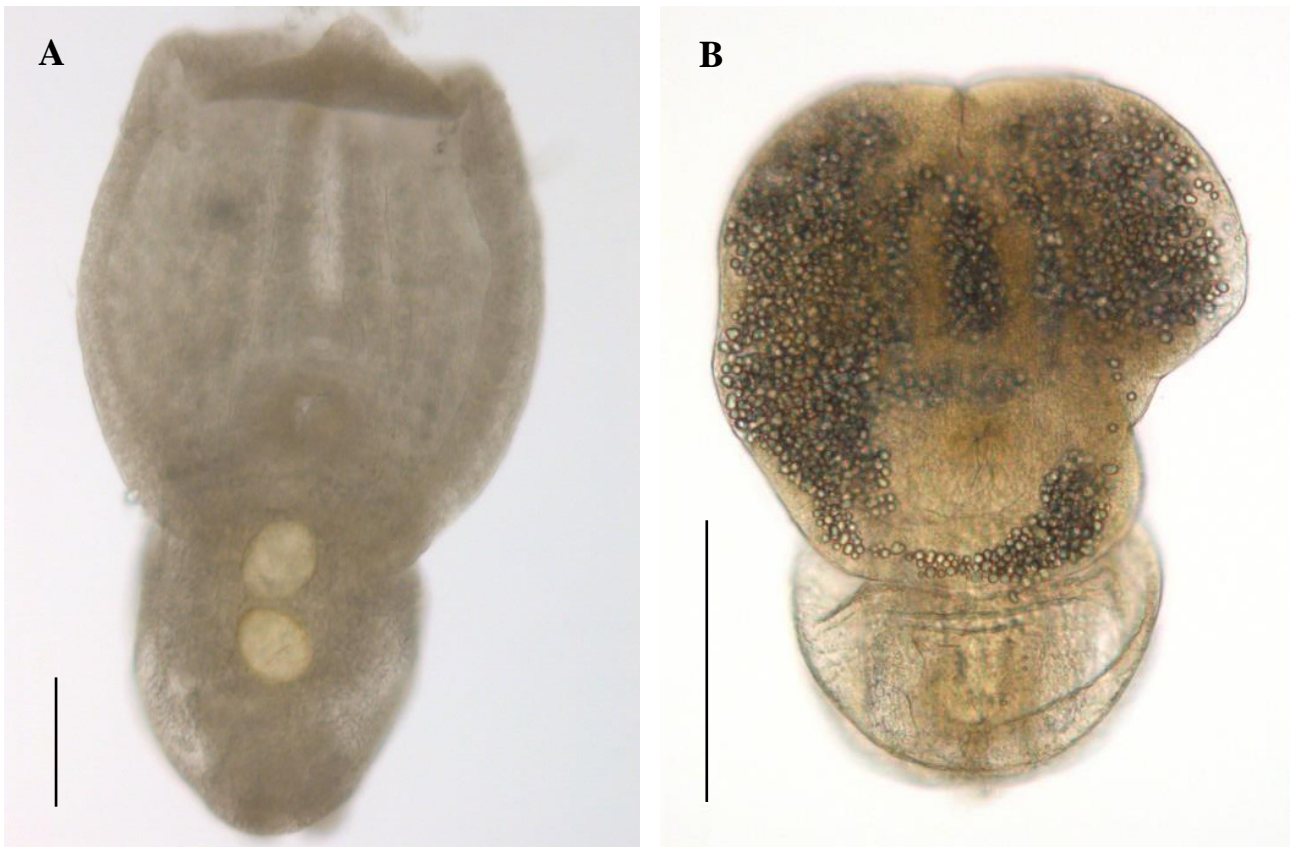
*Sítio de infecção no hospedeiro: intestino (Ardea alba, Ardea cocoi), retina, humor vítreo (Mesonauta acora).*

*Localidade: rio Jari, Amapá (1°07'31.6"S, 51°59'38.8"W).*

#### *Comentários*

Os espécimes adultos de *Posthodiplostomum* sp. 12 foram coletados em hospedeiros ardeídeos, bem como outras espécies do gênero aqui apresentadas, *Posthodiplostomum* sp. 10 e *Posthodiplostomum* sp. 15, além das espécies previamente descritas *Posthodiplostomum grande* (Diesing, 1850) Dubois, 1936 e *Posthodiplostomum mignum* Boero, Led & Brandetti, 1972. A presente espécie se distingue por apresentar menor tamanho (média de 635 µm em

*Posthodiplostomum* sp. 12 vs 1294  $\mu\text{m}$  em *Posthodiplostomum* sp. 10, 1394  $\mu\text{m}$  em *Posthodiplostomum* sp. 15, 1940  $\mu\text{m}$  em *Posthodiplostomum grande* e 880  $\mu\text{m}$  em *Posthodiplostomum mignum*), segmento anterior oval (vs espatulada em *Posthodiplostomum* sp. 13 e *Posthodiplostomum* sp. 15), segmento posterior em forma de bulbo (vs cilíndrico em *Posthodiplostomum* sp. 10, lanceolado em *Posthodiplostomum* sp. 15, arredondado em *P. grande*), ventosa ventral subesférica (vs esférica em *Posthodiplostomum* sp. 15 e ventosa ventral oval muito larga em *P. mignum*), além de ovos grandes. As metacercárias foram identificadas em cisto grande em relação ao tamanho do parasito e de parede fina. Pode ser distinguida das demais espécies pelo conjunto das seguintes características: ventosa oral oval alongada, faringe alongada, presença pré-faringe, ventosa ventral maior que órgão tribocítico.



**Figura 6.** Fotomicrografia de *Posthodiplostomum* sp. 12. **A.** Espécime adulto coletado em *Ardea cocoi* Linnaeus, vista ventral. **B.** Espécime em estágio de metacercária coletado no humor vítreo de *Mesonauta acora* (Castelnau). Barra de escala: A-100  $\mu\text{m}$ ; B-200  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.3.4 *Posthodiplostomum* sp. 13

*Descrição* (Figura 7)

*Metacercária* [baseada em espécimes coletados em *Australoheros* sp., localidade: rio Jari, Amapá; 2 espécimes fixados em água quente, medidas na Tabela 4].

Corpo distintamente bipartido. Segmento anterior alongado, com concavidade ventral. Segmento posterior pequeno, oval. Ventosa oral pequena, oval, subterminal. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral oval, maior que ventosa oral. Pré-faringe indistinta. Faringe pequena, subsférica. Esôfago curto e afilado. Ceco longo, afilado, terminando cego posteriormente ao testículo posterior. Órgão tribocítico subsférico com abertura longitudinal tipo fenda, localizado próximo à margem posterior do segmento anterior. Glândula proteolítica bipartida, situada à margem posterior do órgão tribocítico. Dois testículos primordiais, lobados, testículo anterior menor que o posterior, testículo posterior bifurcado. Ovário primordial subsférico, lateral. Bolsa copulatória globular com abertura terminal. Poro genital terminal. Sistema excretor tipo '*neascus*', composto por um canal mediano ramificado e dois canais laterais de cada lado formando rede no segmento anterior; canais mais laterais com numerosas anastomoses. Concreções excretoras pequenas, livres nos canais do segmento anterior.

*Sumário taxonômico*

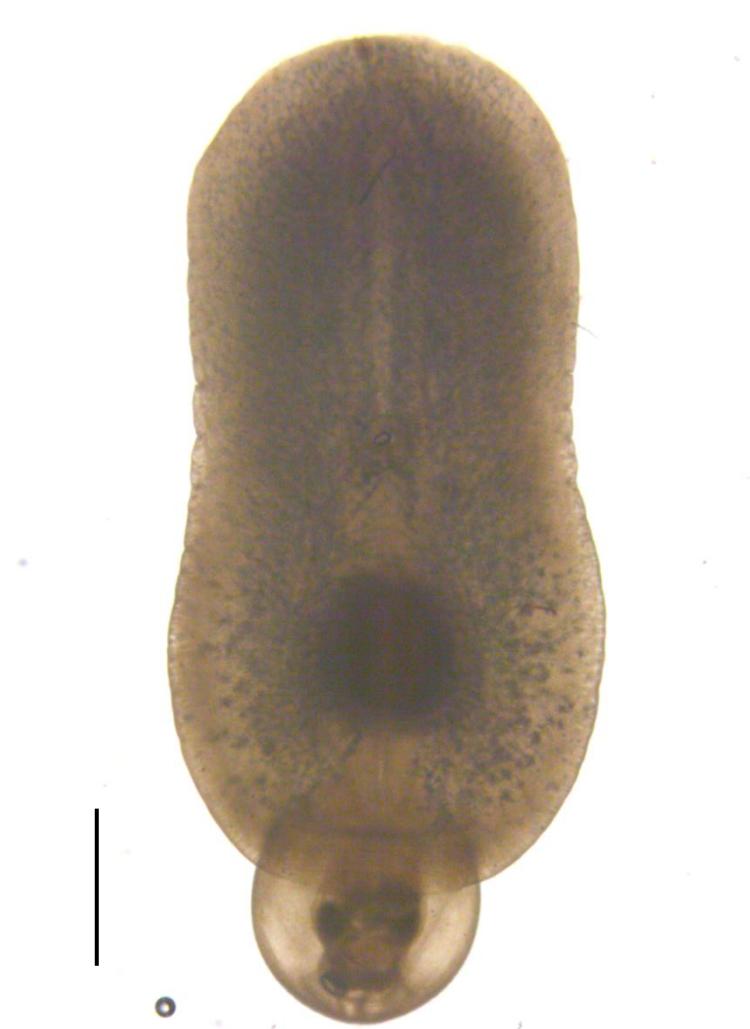
*Segundo hospedeiro intermediário: Australoheros* sp. (Cichliformes: Cichlidae).

*Sítio de infecção no hospedeiro: esclera (Australoheros* sp.).

*Localidade: rio Jari, Amapá (1°07'31.6"S, 51°59'38.8"W).*

*Comentários*

*Posthodiplostomum* sp. 13 é a espécie que mais se distingue das demais excepcionalmente pelo grande tamanho, enquanto as demais alcançaram o comprimento máximo de 2800 µm a presente apresentou comprimento entre 6084-7154 µm. Coletada nos olhos, na região esclera, o tamanho contrasta com os parasitos mesmo de outros gêneros encontrados frequentemente nesta região. A presente espécie pode ser distinguida ainda pelo segmento posterior curto e oval (*vs* segmento posterior em forma de bulbo) e ventosa oral pequena subterminal.



**Figura 7.** Fotomicrografia de metacercária de *Posthodiplostomum* sp. 13 coletado em *Australoheros* sp., vista ventral. Barra de escala: 1 mm.

#### 4.3.3.5 *Posthodiplostomum* sp. 14

*Descrição* (Figura 8)

*Metacercária* [baseada em espécimes coletados em *Crenicichla* sp., localidade: rio Jari, Amapá; 8 espécimes fixados em água quente, medidas na Tabela 4]. Corpo distintamente bipartido. Segmento anterior alongado, com concavidade ventral. Segmento posterior em forma de bulbo. Ventosa oral oval, terminal. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral oval, maior que ventosa oral. Pré-faringe presente, pequena. Faringe alongada. Esôfago curto e afilado. Ceco longo, afilado, terminando cego posteriormente ao testículo posterior. Órgão tribocítico oval com abertura longitudinal tipo fenda, localizado próximo à margem posterior do segmento anterior. Dois testículos primordiais, lobados, testículo anterior menor que o posterior, testículo posterior bifurcado. Ovário primordial oval, lateral. Bolsa copulatória globular com abertura



terminal. Poro genital terminal. Sistema excretor tipo 'neascus', composto por um canal mediano ramificado e dois canais laterais de cada lado formando rede no segmento anterior; canais mais laterais com numerosas anastomoses. Concreções excretoras pequenas, denso, livres nos canais do segmento anterior.

#### *Sumário taxonômico*

*Segundo hospedeiro intermediário: Crenicichla sp. (Cichliformes: Cichlidae); Geophagus brasiliensis (Quoy & Gaimard) (Cichliformes: Cichlidae); Centropomus undecimalis (Bloch) (Cichliformes: Centropomidae).*

*Sítio de infecção no hospedeiro: retina, bexiga natatória (Crenicichla sp.); cérebro, esclera, humour vítreo (Geophagus brasiliensis); intestino (Centropomus undecimalis).*

*Localidade: Centropomus undecimalis e Geophagus brasiliensis: rio Guandu, Rio de Janeiro (22°81'S, 43°62'W); Crenicichla sp.: rio Jari, Amapá (1°07'31.6"S, 51°59'38.8"W).*

#### *Comentários*

Consideramos que a espécie aqui identificada como *Posthodiplostomum sp. 15* é sinônimo de *Posthodiplostomum sp. 1* descrita previamente por Carvalho et al. (2012), uma vez que apresentam mesmo morfotipo e medidas compatíveis, além de alguns espécimes terem sido encontrados em hospedeiros de mesma espécie, mesmo sítio de infecção e localidade. Locke et al. (2010b) providenciou dados moleculares para oito espécies distintas de *Posthodiplostomum*, identificando-as com uma sequência numerológica de 1-8 sem fornecer dados morfológicos. Por outro lado, Carvalho et al. (2012) descreveu duas metacercárias do gênero identificando-as como espécie 1 e 2, sem apresentar dados moleculares, desconsiderando o trabalho de Locke et al. (2010b). Portanto, há uma sobreposição de espécies identificadas como *Posthodiplostomum sp. 1*, fator pelo qual não manteremos a identificação anterior, apesar de considerarmos-as sinônimas. A presente espécie se distingue das demais pelo seguinte conjunto de caracteres: segmento anterior alongado, dilatado na região anterior afinando posteriormente, testículo anterior oval, testículo posterior bifurcado.



**Figura 8.** Fotomicrografia de metacercária de *Posthodiplostomum* sp. 14 coletado em *Crenicichla* sp., vista ventral. Barra de escala: 250  $\mu$ m.

#### 4.3.3.6 *Posthodiplostomum* sp. 15

*Descrição* (Figura 9 A, B)

*Adulto* [baseada em espécimes coletados em *Ardea cocoi*, localidade: rio Jari, Amapá; 1 espécime fixados em água quente, medidas na Tabela 3]

Corpo distintamente bipartido. Segmento anterior espatulado com concavidade ventral, maior que segmento posterior. Segmento posterior lanceolado. Ventosa oral oval, terminal. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral esférica. Pré-faringe presente. Faringe alongada. Órgão tribocítico pequeno, oval com abertura longitudinal tipo fenda, localizado próximo à margem posterior do segmento anterior. Testículos anterior e posterior ovais. Ovário subsférico ao lado do testículo posterior. Vitelária ultrapassa a região equatorial do segmento

anterior, no segmento posterior estende-se próximo a bolsa copulatória. Bolsa copulatória evaginada com abertura terminal. Ovos grandes, não filamentosos. Sistema excretor do tipo 'neascus' identificado somente na região anterior do corpo com um ramo mediano e dois laterais de cada lado.

*Metacercária* [baseada em espécimes coletados em *Satanoperca jurupari*, localidade: rio Jari, Amapá; 3 espécimes fixados em água quente, medidas na Tabela 3].

Corpo distintamente bipartido. Segmento anterior alongado, com concavidade ventral. Segmento posterior em forma de bulbo. Ventosa oral oval, terminal. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral oval, maior que ventosa oral. Pré-faringe presente, pequena. Faringe alongada. Esôfago curto e afilado. Ceco longo, afilado, terminando cego próximo a bolsa copulatória. Órgão tribocítico oval com abertura longitudinal tipo fenda, localizado próximo à margem posterior do segmento anterior. Dois testículos primordiais, lobados, testículo anterior menor que o posterior, testículo posterior bifurcado. Ovário primordial oval, lateral. Bolsa copulatória com abertura terminal. Poro genital terminal. Sistema excretor tipo 'neascus', composto por um canal mediano ramificado e dois canais laterais de cada lado formando rede no segmento anterior; canais mais laterais com numerosas anastomoses. Concreções excretoras pequenas, livres, denso nos canais do segmento anterior.

#### *Sumário taxonômico*

*Hospedeiro definitivo: Ardea cocoi* Linnaeus (Pelicaniformes: Ardeidae).

*Segundo hospedeiro intermediário: Satanoperca jurupari* (Heckel), *Satanoperca pappaterra* (Heckel) (Cichliformes: Cichlidae).

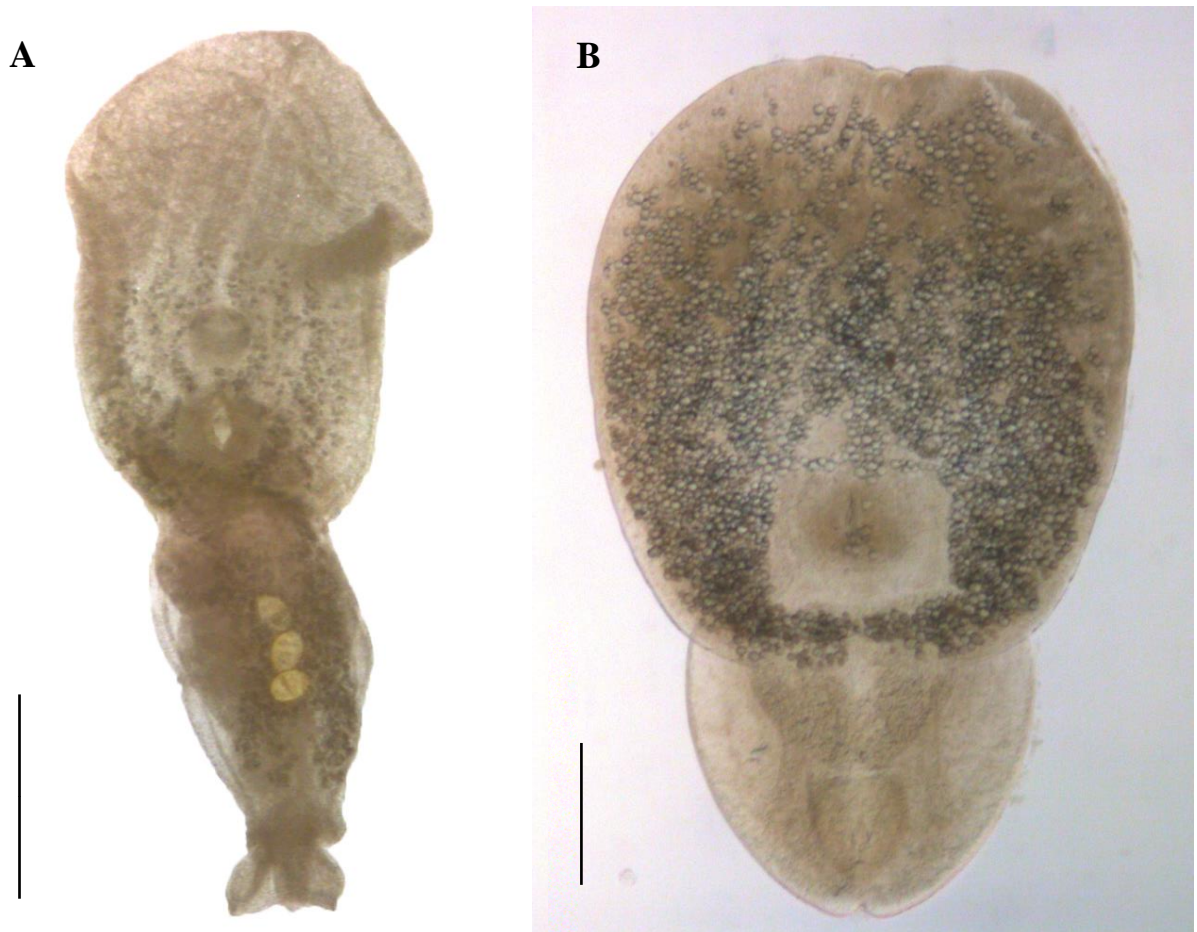
*Sítio de infecção no hospedeiro: brânquias, humor vítreo (Satanoperca jurupari); humor vítreo (Satanoperca pappaterra); intestino (Ardea cocoi).*

*Localidade: Ardea cocoi e Satanoperca jurupari: rio Jari, Amapá (1°07'31.6"S, 51°59'38.8"W); Satanoperca pappaterra: rio tributário do rio Paraná, Porto Rico, Paraná (22°76"S, 53°25'W).*

#### *Comentários*

A elucidação parcial do ciclo de vida de *Posthodiplostomum* sp. 15 foi possibilitada por correspondência das sequências referentes aos espécimes em estágio de metacercária e adulto.

A presente espécie apresentou uma variação intraespecífica de 0-0,2% (0-1 pb) para *cox1* e sequências idênticas para 28S. Em análise molecular dos genes *cox1* e 28S as espécies *Posthodiplostomum* sp. 14 e 15 foram identificadas agrupadas apresentando valores de divergência interespecífica em 10% (38-40 pb) para *cox1* e 0,2-0,3% (3 pb) para 28S. A presente espécie se distingue morfológicamente pelo segmento anterior espatulado, relação entre comprimento do segmento anterior e posterior de 1:1,2; presença de pré-faringe curta, ventosa ventral esférica duas vezes maior que o comprimento que a ventosa oral.



**Figura 9.** Fotomicrografia de espécimes de *Posthodiplostomum* sp. 15. **A.** Espécime adulto coletado em *Ardea cocoi* Linnaeus, vista ventral; **B.** Espécime em estágio de metacercária coletado em *Satanoperca jurupari* (Heckel). Barra de escala: A-B: 200  $\mu$ m

Subfamília Crassiphialinae Sudarikov, 1960

Gênero *Uvulifer* Yamaguti, 1934

#### 4.3.3.7 *Uvulifer* sp. 2

*Descrição* (Figura 10)

*Metacercária* [baseada em espécime coletado em *Cichla monoculus*, localidade: rio Jari, Vitória do Jari, Amapá; 1 espécime fixado diretamente em álcool absoluto, medidas na Tabela 5]. Metacercária encistada na nadadeira. Cisto esférico, duro, envolvido externamente por uma espessa camada enegrecida, camada interna fina. Corpo bipartido, achatado. Segmento anterior largo, afilado próximo a ventosa oral. Segmento posterior curto. Ventosa oral oval muscular. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral oval, situado na região pré-equatorial. Faringe oval. Esôfago longo. Ceco longo, terminando cego próximo aos testículos. Órgão tribocítico esférico, próximo a margem posterior do segmento anterior. Dois testículos esféricos em desenvolvimento, em posição tandem. Ovário primordial oval, entre os testículos, não bem definido, contíguo aos testículos. Sistema excretor tipo ‘neascus’, formado por um canal mediano e dois laterais formando uma rede no segmento anterior, canais conectados por comissuras no segmento posterior. Concreções excretoras livres, com formato irregular, denso no segmento anterior, estendendo da ventosa oral passando ao redor da ventosa ventral e do órgão tribocítico, no segmento posterior distribuído na região central. Bolsa copulatória primordial ovoide, poro genital terminal.

*Sumário taxonômico*

*Segundo hospedeiro intermediário: Cichla monoculus* Agassiz (Cichliformes: Cichlidae).

*Sítio de infecção no hospedeiro: nadadeira.*

*Localidades: rio Jari, Amapá (1°07'31.6"S 51°59'38.8"W).*

*Comentários*

Como citado anteriormente, a presente espécie foi assim classificada devido a similaridade genética com *Uvulifer* sp. Linhagem 2 identificada por López-Jiménez et al. (2017). A presente espécie pode ser distinguida das demais por apresentar menor comprimento entre todas metacercárias previamente descritas. Além do segmento posterior curto, isto é,

relação entre comprimento do segmento posterior e comprimento total do corpo 1:2,6 (vs relação de 1:0,6 para *Uvulifer* sp. 5; 1:1,9 em *Uvulifer* sp. 4), esôfago curto com 26  $\mu\text{m}$  de comprimento (vs esôfago 41  $\mu\text{m}$  com para *Uvulifer* sp. 5 e 65–77  $\mu\text{m}$  de comprimento em *Uvulifer iruvettiensis*). O presente espécime distingue-se ainda pelos segmentos anterior e posterior de larguras semelhantes, isto é, relação entre largura do segmento posterior e anterior de 1: 0,9 em *Uvulifer* sp. 2 (vs 1:1,3 em *Uvulifer spinatus*; 1:1,4 em *Uvulifer* sp. 5; 1:1,8 em *Uvulifer* sp. 4 e 1:2,4 em *Uvulifer ambloplitis*). *Uvulifer* sp. 2 apresenta região anterior afilada próximo à ventosa oral como de *Uvulifer ambloplitis*, entretanto distingue-se pela ventosa oral menor, órgão tribocítico maior que ventosa oral (vs ventosa oral maior que órgão tribocítico), ventosa ventral oval (vs ventosa ventral redonda).



**Figura 10.** Fotomicrografia de metacercária de *Uvulifer* sp. 2 coletado em *Cichla monoculus* Agassiz, vista ventral. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 5.** Dados morfométricos comparativos entre metacercárias do gênero *Uvulifer*.

Espécie	<i>Uvulifer</i> sp. 2	<i>Uvulifer</i> sp. 4	<i>Uvulifer</i> sp. 5	<i>Uvulifer ambloplitis</i> (Hughes, 1927) Dubois 1938	<i>Uvulifer iruvettiensis</i> Subair, Brinsh & Janardanan, 2013	<i>Uvulifer spinatus</i> López- Jiménez, Pérez-Ponce de León & García-Varela, 2018
<b>Hospedeiro</b>	<i>Cichla monoculus</i> Agassiz	<i>Tilapia sparrmanii</i> Smith	<i>Phalacrocorax</i> <i>brasilianus</i> (Gmelin)	<i>Ambloplites rupestris</i> (Rafinesque)	<i>Euphlyctis cyanophlyctis</i> (Schneider)	<i>Poeciliopsis occidentalis</i> Baird & Girard
<b>Localidade</b>	Rio Jari, Amapá, Brasil	Rio Mooi, África do Sul	Rio Jari, Amapá, Brasil	Lago Douglas, Michigan, Estados Unidos	Kerala, Índia	Sonora, México
<b>Referência</b>	Presente estudo	Hoogendoorn et al. (2019)	Presente estudo	Hughes (1927)	Subair et al. (2013)	López-Jiménez et al. (2017)
<b>Tamanho amostral</b>	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 1	<i>n</i> = 2	<i>n</i> = 5	não informado	<i>n</i> = 6
CC	389	1015	573	369–390 (10)	231–374	–
LC	263	850	484	172–236 (10)	218–262	–
CT	366	1286	1050	–	501–593	592-677
CSA	225	678	425 (1)	300–675 (5)	301–362	–
LSA	205	262	318 (1)	180–232 (5)	208–231	–
CSP	138	688	491–595	330–675 (5)	193–231	–
LSP	192	149	222 (1)	75–112 (5)	172–207	–
CVO	36	71	80–81	60–75 (4)	77–92	65-75
LVO	50	65	46–73	60–75 (4)	54–83	51-59
CVV	35	–	33–61	–	–	39-49
LVV	45	–	34–78	30–38 (4)	31–46	45-50
CPF	Indistinta	–	ausente	–	pequena	ausente
CF	18	–	27–43	–	31–39	31-34
LF	21	–	17–29	–	–	21-23
CE	26	–	41	–	65–77	–
LE	21	–	9	–	–	–
COT	53	259	80–88	52–60 (3)	–	86–128
LOT	58	297	82–81	–	77–93	92–110
COV	16	–	43	–	–	–
LOV	14	–	37	–	–	–
CTA	29	–	71	–	61–77	–
LTA	38	–	78	–	–	–
CTP	25	–	78	–	65–78	–
LTP	35	–	72	–	–	–

\*Dados em parênteses referem-se ao número de espécimes medidos.

#### 4.3.3.8 *Uvulifer* sp. 5

*Descrição* (Figuras 11 A, B)

*Metacercária 1* [baseada em espécime coletado em *Phalacrocorax brasilianus*, localidade: rio Jari, Vitória do Jari, Amapá; 1 espécime fixado diretamente em álcool absoluto, medidas na Tabela 5]. Corpo bipartido. Segmento anterior foliáceo com distinta concavidade ventral. Segmento posterior longo, cilíndrico. Ventosa oral oval. Pseudoventosas ausentes. Ventosa ventral oval, localizado anterior ao órgão tribocítico. Pré-faringe ausente ou indistinta. Faringe alongada. Esôfago curto. Cecos alcançam o segmento posterior. Órgão tribocítico situado próximo à margem posterior do segmento anterior. Testículos e ovário não visualizados. Concreções excretoras não visualizadas. Sistema excretor do tipo ‘neascus’, formado por uma ramificação mediana e dois canais laterais no segmento anterior.

*Metacercária 2* [baseada em espécime coletado em *Phalacrocorax brasilianus*, figura 3B, localidade: rio Jari, Vitória do Jari, Amapá; 1 espécime fixado diretamente em álcool absoluto, medidas na Tabela 2]. *Metacercária* encistada no estômago. Cisto ovóide, parede fina. Corpo bipartido. Ventosa oral oval. Pseudoventosas ausente. Ventosa ventral oval, localizado anterior ao órgão tribocítico. Órgão tribocítico oval com abertura tipo fenda, próximo a margem posterior do segmento anterior. Testículos e ovário não visualizados. Concreções excretoras com formato irregular, denso, localizados no segmento anterior do corpo.

*Sumário taxonômico*

*Hospedeiro intermediário: Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin) (Suliformes: Phalacrocoracidae).

*Sítio de infecção no hospedeiro: estômago*

*Localidades: rio Jari, Amapá (1°07'31.6"S 51°59'38.8"W).*

*Comentários*

Os espécimes foram aqui descritos de forma individual para melhor detalhamento. A presente espécie descrita é representada por um espécime encistado na qual não foi possível retirá-lo totalmente do cisto, apresentando-se enrolado, fator que dificultou a descrição. Além de outro espécime encontrado livre, cabe ressaltar que há possibilidade deste ter se desencistado

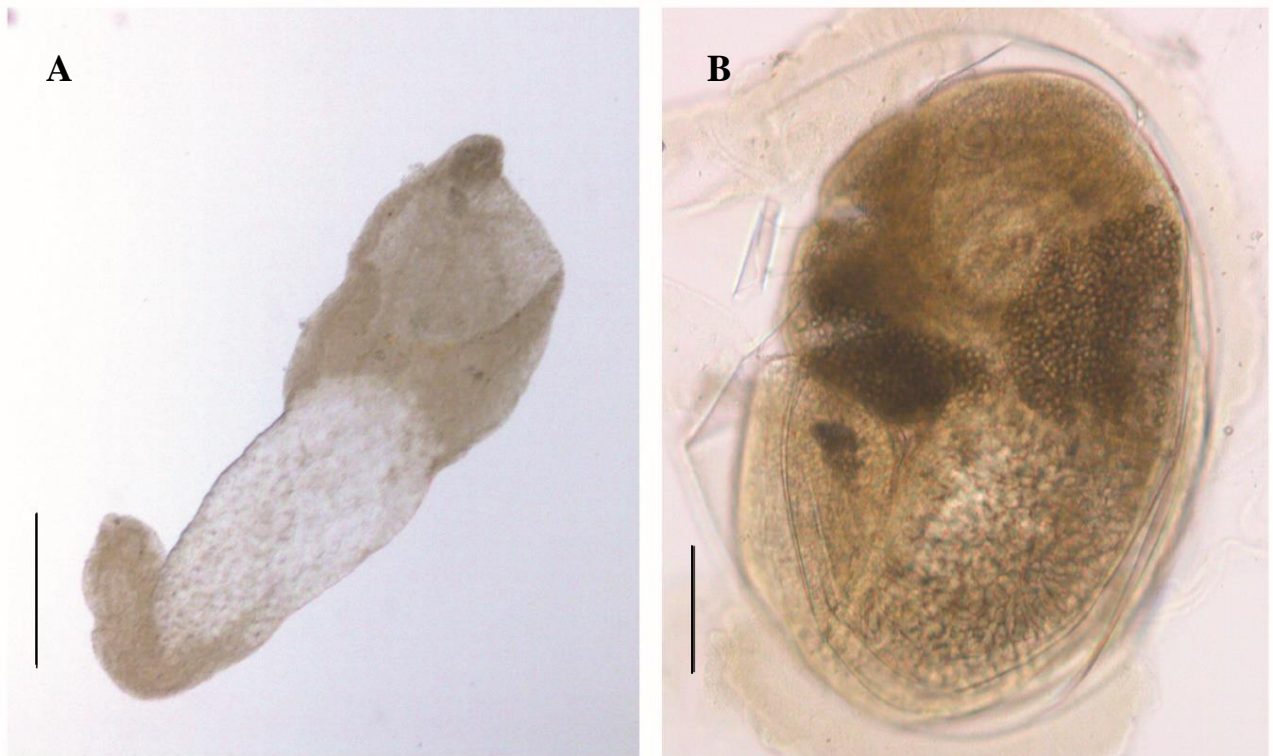


no momento da necropsia e triagem do material. Em ambos espécimes não foram identificados testículos, ovário e vitelária desenvolvidos, bem como qualquer caractere que identifique desenvolvimento adulto. Os espécimes apresentam características condizentes com metacercária do tipo 'neascus', isto é, corpo bipartido, segmento anterior foliáceo, segmento posterior bem desenvolvido, sistema excretor formado por uma ramificação mediana e dois canais laterais.

As espécies do gênero *Uvulifer* no estágio de metacercária são encontradas em peixes como segundo hospedeiro intermediário e possuem como particularidade a infecção de indivíduos adultos no intestino de hospedeiros da família Alcedinidae. A presente espécie em estágio de metacercária foi coletada no estômago de uma ave que embora se alimente de peixe, pertence à família Phalacrocoracidae. Diferente dos outros cistos por nós encontrados além dos descritos na literatura, este foi coletado internamente no estômago sem a presença de pigmentos escuros e estrutura rígida. Vale ressaltar que embora este não seja o hospedeiro considerado ideal, os cistos tornam-se enegrecidos e rígidos de forma gradual, podendo neste caso indicar uma recente infecção. Consideramos que estas diferenças se devem a este não ser o hospedeiro desejado ou específico e, portanto, este seja considerado um hospedeiro acidental, visto que os espécimes estão em estágio de metacercária e não há qualquer desenvolvimento ao estágio adulto.

Ambos espécimes aqui analisados foram coletados do mesmo espécime de hospedeiro, sítio de infecção e apresentaram alta similaridade genética, isto é, variabilidade intraespecífica de três pares de base e 0,8% de divergência genética em análise das sequências do gene *cox1*, sem qualquer diferença na análise do gene 28S. Em análise da árvore filogenética para o gene *cox1*, esta espécie não agrupou com qualquer sequência existente para a região gênica analisada. Como citado anteriormente, *Uvulifer* sp. 5 agrupou com *Uvulifer elongatus* em análise do gene 28S e embora esta espécie também possua registro em região amazônica, todos registros de *Uvulifer elongatus* se referem a espécimes adultos, impedindo comparações morfológicas com a espécie por nós descrita.

A presente espécie assemelha-se ainda a *U. ambloplitis* e *Uvulifer* sp. 4 por apresentar segmento posterior alongado, entretanto diferenciam-se pelo órgão tribocítico menor em *U. ambloplitis* (52–60 µm de comprimento), maior em *Uvulifer* sp. 4 (259 µm) em relação à *Uvulifer* sp. 5 (79,8–87,5 µm). Há poucas medidas referentes à *Uvulifer* sp. 4, impedindo maiores comparações. Em análise do gene 28S, *Uvulifer* sp. 5 apresenta divergência genética de 14 pb para *U. ambloplitis* e 10 pb para *Uvulifer* sp. 4.



**Figura 11.** Fotomicrografia de espécimes de *Uvulifer* sp. 5 coletados em *Phalacrocorax brasilianus*, **A.** Espécime adulto coletado livre no hospedeiro, vista ventral; **B.** Espécime em estágio de metacercária encistado. Barra de escala: A-200  $\mu\text{m}$ , B-100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4 DISCUSSÃO

A subfamília Crassiphialinae foi classificada inicialmente como uma tribo da subfamília Diplostominae. Gibson (1996) reconheceu o status de subfamília, que é aceito atualmente, além de transferir os gêneros *Posthodiplostomum* e *Ornithodiplostomum* para esta devido a metacercária do tipo ‘neascus’. De fato, por meio de análise molecular é perceptível tanto a divisão entre ambas subfamílias, quanto uma maior similaridade de *Posthodiplostomum* e *Ornithodiplostomum* à Crassiphialinae. Recentes estudos identificam ambos gêneros agrupados com *Bolbophorus* Dubois, 1935 e como clado irmão à *Crassiphiala* e *Uvulifer*, reafirmando a atual classificação. Segundo Niewiadomska (2002b), a subfamília Crassiphialinae é composta atualmente por 15 gêneros, entretanto somente quatro apresentam algum dado molecular, isto é, *Bolbophorus*, *Crassiphiala*, *Posthodiplostomum* e *Uvulifer*.

Difundido ao redor do mundo, o gênero *Posthodiplostomum* é composto por mais de 25 espécies, sendo 11 espécies com registro no continente americano e 7 somente na América do Sul com possibilidade deste número aumentar após a inclusão de dados moleculares para região (ver Tabela 6 no presente estudo - RITOSSA et al. 2013; LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al. 2018). De acordo com Fernandes et al. (2015), há registro no Brasil de 5 espécies do gênero, isto é, *P. grande*; *P. macrocotyle* Dubois 1937; *P. microsicya* Dubois 1936; *P. nanum* e *P. obesum*. Apenas duas espécies foram registradas em outros países na América do Sul e não apresentam registros no Brasil, estas são: *P. giganteum* Dubois, 1988 e *P. mignum*. Dos registros referentes ao estágio de metacercária na região apenas duas espécies foram identificadas, grande parte dos registros associados ao gênero não identificam a nível de espécie (ver Tabela 6 para detalhes).

Alguns estudos incorporaram dados moleculares ao grupo, entretanto estes dados se referem principalmente a espécimes coletados no Canadá, Japão e alguns países da Europa. López-Hernández et al. (2018) forneceram o único dado referente a América do Sul, este relativo a cercária localizada em Minas Gerais, Brasil (ver Tabela 1). Portanto, o presente estudo é o segundo a incorporar dados referentes à *Posthodiplostomum* na América do Sul e o primeiro referente aos estágios de metacercárias e adultos.

Ainda sob discussão, a especificidade do gênero tanto ao segundo hospedeiro intermediário quanto ao sítio de infecção tem sido avaliada pela literatura. A incorporação de dados moleculares é um fator importante que tem permitido o delineamento das espécies como a identificação de novas espécies, espécies crípticas, além da associação de diferentes estágios de vida (LANE et al. 2015; STOYANOV et al. 2017; BOONE et al. 2018).

**Tabela 6.** Lista de espécies do gênero *Posthodiplostomum* reportados na América do Sul.

Espécies	E	Espécie do hospedeiro	País de origem	Referências	
<i>Posthodiplostomum giganteum</i> Dubois, 1988	A	* <i>Butorides striata striata</i> (Linnaeus)	Paraguai	Dubois (1988); Fernandes et al. (2015)	
<i>Posthodiplostomum grande</i> (Diesing, 1850)	A	* <i>Agamia agami</i> (Gmelin)	Mato Grosso, Brasil	Dubois (1938); Travassos et al. (1969)	
	A	* <i>Ardea alba egretta</i> Gmelin	Brasil	Dubois (1953); Travassos et al. (1969)	
<i>Posthodiplostomum macrocotyle</i> Dubois, 1937	A	** <i>Bussarellus nigricollis</i> (Latham)	Argentina		
	A	† <i>Rynchops niger</i> Linnaeus	Brasil	Dubois (1938, 1937, 1970); Travassos et al. (1969)	
	A	Φ <i>Spheniscus magellanicus</i> (Forster)	Brasil	Brandão et al. (2013)	
	M	× <i>Trachelyopterus striatulus</i> (Steindachner)	Rio Guandu, Rio de Janeiro, Brasil	Azevedo et al. (2010); Mesquita et al. (2011)	
	M	§ <i>Geophagus brasiliensis</i> (Quoyb Gaimard)	Rio Guandu, Rio de Janeiro, Brasil	Azevedo et al. (2006, 2010)	
<i>Posthodiplostomum microsicya</i> Dubois, 1936	A	* <i>Agamia agami</i>	Brasil	Dubois (1938); Travassos et al. (1969)	Brasil
	A	* <i>Botaurus pinnatus</i> (Wagler)	Brasil	Dubois (1938, 1970b); Travassos et al. (1969)	
<i>Posthodiplostomum mignum</i> Boero, Led & Brandetti, 1972	A	* <i>Ardea cocoi</i> Linnaeus	Argentina	Boero et al. (1972a)	
<i>Posthodiplostomum nanum</i> Dubois, 1937	A	* <i>Ardea alba</i> Linnaeus	Argentina	Drago & Lunaschi (2011a); Fernandes et al. (2015)	
	A	* <i>Ardea alba egretta</i> Gmelin	Argentina	Fernandes et al. (2015)	
	A	** <i>Busarellus nigricollis</i> (Latham)	Argentina	Lunaschi & Drago (2009); Fernandes et al. (2015)	
	A	* <i>Butorides striata striata</i>	Argentina	Dubois (1985, 1988); Fernandes et al. (2015)	
	M	◦ <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> (Jenyns)	Rio da Prata, Argentina	Ostrowski de Nuñez (1973)	
	C	Λ <i>Uncancylus concentricus</i> (d'Orbigny)	Rio da Prata, Argentina	Ostrowski de Nuñez (1973)	
	A	* <i>Ixobrychus involucris</i> (Vieillot)	Argentina	Fernandes et al. (2015)	
	M	◦ <i>Phalloceros caudimaculatus</i> (Hensel)	Rio da Prata, Argentina	Ostrowski de Nuñez (1973)	
	A	× <i>Plegadis chihi</i> (Vieillot)	Bueno Aires, Argentina	Digiani et al. (2000); Fernandes et al. (2015)	
	A	* <i>Tigrisoma lineatum</i> (Boddaert)	Argentina	Fernandes et al. (2015)	
	A	* <i>Butorides striata striata</i>	Brasil	Travassos et al. (1969); Pinto et al. (2013)	
	A	* <i>Butorides virescens</i> (Linnaeus)	Brasil	Dubois (1937, 1938, 1985)	
	A	* <i>Nyctanassa violácea</i> (Linnaeus)	Brasil	Fernandes et al. (2015)	
	A	† <i>Pitangus sulphuratus</i> (Hellmayr)	Brasil	Dubois (1970); Fernandes et al. (2015)	

**Tabela 6. (continuação)**

<b>Espécies</b>	<b>E</b>	<b>Espécie do hospedeiro</b>	<b>País de origem</b>	<b>Referências</b>
<i>Posthodiplostomum nanum</i>	A	* <i>Tigrisoma lineatum</i>	Brasil	Dubois (1970); Fernandes et al. (2015)
	C	Λ <i>Gundlachia ticaga</i> (Marcus & Marcus)	Minas Gerais, Brasil	López-Hernández et al. (2018)
	M	◦ <i>Poecilia reticulata</i> Peters	Minas Gerais, Brasil	Pinto & Melo (2012a), López-Hernández et al. (2018)
	A	# <i>Mus musculus</i> (Schwartz & Schwartz)	Minas Gerais, Brasil	López-Hernández et al. (2018)
	A	* <i>Butorides virescens maculata</i>	Colômbia	Drago & Lunaschi (2011); Fernandes et al. (2015)
	A	** <i>Busarellus nigricollis</i>	Paraguai	Fernandes et al. (2015)
	A	* <i>Butorides striata striata</i>	Paraguai	Dubois (1985); Fernandes et al. (2015)
	A	† <i>Pitangus sulphuratus</i>	Venezuela	Drago & Lunaschi (2011); Fernandes et al. (2015)
	A	* <i>Tigrisoma lineatum marmoratum</i> (Vieillot)	Venezuela	Drago & Lunaschi (2011); Fernandes et al. (2015)
<i>Posthodiplostomum obesum</i> (Lutz, 1928)	A	* <i>Phalacrocorax brasilianus</i> Reichenbach	Buenos Aires, Argentina	Ostrowski de Núñez (1970); Nasir & Diaz (1972)
	A	* <i>Phalacrocorax brasilianus</i>	Brasil	Dubois (1938)
	A	* <i>Phalacrocorax brasilianus</i>	Venezuela	Lutz (1928); Caballero & Diaz-Ungria (1958); Diaz-Ungria (1973); Fischthal & Nasir (1974)
<i>Posthodiplostomum</i> sp.	M	§ <i>Astronotus ocellatus</i> Agassiz	Rio Coari Grande, Amazonas, Brasil	Tavares-Dias et al. (2014)
	M	§ <i>Astronotus ocellatus</i>	Rio Tapajós, Pará, Brasil	Pinheiro et al. (2019)
	M	§ <i>Astronotus ocellatus</i>	Lago Pracaúba, Amapá, Brasil	Tavares-Dias et al. (2011)
	M	§ <i>Geophagus brasiliensis</i>	Rio Guandu, Rio de Janeiro, Brasil	Carvalho et al. (2010, 2012); Azevedo et al. (2010)
	M	Θ <i>Triportheus rotundatus</i> Jardine	Amapá, Brasil	Santos & Tavares-Dias (2017)

*Abreviações:* E, Estágio do ciclo de vida; A, adulto; M, metacercária; C, cercária. *Símbolos para ordem e família do hospedeiro:* Aves: \*\*Accipitriformes: Accipitridae; #Charadriiformes: Rynchopidae; †Passeriformes: Tyrannidae; \*Pelicaniformes: Ardeidae; ×Pelicaniformes: Threskionithidae; #Rodentia: Muridae (experimental); ΦSphenisciformes: Spheniscidae; \*Suliformes: Phalacrocoracidae; Pisces: ΘCharaciformes: Tryportheidae; ◦Cyprinodontiformes: Poeciliidae; §Cichliformes: Cichlidae; ×Siluriformes: Auchenipterinae; Mollusca: ΛGastropoda: Ancyliidae.

Todas espécies com metacercárias aqui descritas foram identificadas em hospedeiros da família Cichlidae. *Posthodiplostomum* sp. 14, entretanto, foi identificada tanto em ciclídeos quanto em um espécime de centroponimídeo *C. undecimalis*. Curiosamente esta espécie foi identificada somente em espécimes de *Crenicichla* sp. no rio Jari, enquanto no rio Guandu foi identificado em *Geophagus brasiliensis* e no acima citado *C. undecimalis*. A especificidade de metacercárias diplostomoídeos são por vezes descritas como resultado de compatibilidade fisiológica entre parasitos e hospedeiros, hipótese esta que suportaria o presente resultado (LOCKE et al. 2010b; BOONE et al. 2018).

Consoante com a literatura, todos espécimes adultos de *Posthodiplostomum* foram recuperados de hospedeiros da família Ardeidae e Phalacrocoracidae, isto é, *Posthodiplostomum* sp. A e F em *Ardea cocoi*, *Posthodiplostomum* sp. C em *Ardea alba* e *A. cocoi*; *Posthodiplostomum* sp. B em *Phalacrocorax brasilianus*. *Uvulifer*, no entanto, foi recuperado em hospedeiro divergente da especificidade considerada pela literatura, identificado em *Phalacrocorax brasilianus* (Phalacrocoracidae), hospedeiro este considerado por nós como acidental, sendo o primeiro registro do gênero em hospedeiro não Alcedinidae.

O gênero *Uvulifer* atualmente é composto por 21 espécies válidas distribuídas mundialmente (NIEWIADOMSKA, 2002b), sendo que oito espécies foram descritas na Ásia (seis somente na Índia), quatro na África, uma na Europa e oito nas Américas (SUBAIR et al. 2013, LÓPEZ-JIMÉNEZ et al. 2017). Destacaremos aqui as espécies com registro na região Neotropical, e para tal, detalharemos os registros referentes a nível de espécie na Tabela 7, incluindo aquelas identificadas apenas com dados moleculares, isto é, *Uvulifer* sp. Linhagem 1, 2, 3. Quanto ao Estados Unidos e o Canadá foram reportadas somente duas espécies, *Uvulifer ambloplitis* (Hughes, 1927) Dubois, 1938 reportada em estágio de metacercária em ampla diversidade de hospedeiros e *Uvulifer semicircumcicus* Dubois & Rausch, 1950 em aves *Megaceryle alcyon* (Linnaeus).

Todos relatos referentes ao gênero na América do Sul abordam o estágio adulto. No Brasil foram relatadas as ocorrências de três espécies, *U. elongatus*, *U. prosocotyle* e *U. weberi* (ver Tabela 7 para mais detalhes). Portanto, estas são as primeiras metacercárias descritas, utilizando de taxonomia integrativa, como pertencentes a *Uvulifer* relatadas na América do Sul. Nenhum dos espécimes por nós analisados apresentou similaridade com estes adultos, ao que se refere a dados moleculares, demonstrando serem espécies diferentes. Assim como nossos espécimes, *Uvulifer elongatus* também foi relatado na bacia amazônica, local com a presença de diferentes espécies de martim-pescador, demonstrando que a região apresenta potencial para ampla diversidade de espécies de *Uvulifer*.

**Tabela 7.** Lista de espécies do gênero *Uvulifer* reportados na região Neotropical.

Espécies	E	Espécie do hospedeiro	País de origem	Referências
<i>Uvulifer ambloplitis</i> (Hughes, 1927) Dubois 1938	M	Φ <i>Agonostomus monticola</i> (Brancroft)	Hidalgo, México	Salgado-Maldonado et al. (2005), Pérez-Ponce de Leon et al. (2007)
	M	* <i>Astyanax aeneus</i> (Günther)	Hidalgo, México	Salgado-Maldonado et al. (2005), Pérez-Ponce de Leon et al. (2007)
	M	§ <i>Cichlasoma</i> sp.	Hidalgo, México	Salgado-Maldonado et al. (2005), Pérez-Ponce de Leon et al. (2007)
	M	** <i>Dormitator maculatus</i> (Bloch)	Hidalgo, México	Salgado-Maldonado et al. (2005), Pérez-Ponce de Leon et al. (2007)
	M	** <i>Gobiomorus dormitor</i> Lacepède	Hidalgo, México	Salgado-Maldonado et al. (2005), Pérez-Ponce de Leon et al. (2007)
	M	§ <i>Mayaheros urophthalmus</i> (Günther)	Hidalgo, México	Salgado-Maldonado et al. (2005), Pérez-Ponce de Leon et al. (2007)
	M	§ <i>Nosferatu labridens</i> (Pellegrin)	Hidalgo, México	Aguilar-Aguilar et al. (2004); Salgado-Maldonado et al. (2004)
	M	* <i>Heterandria bimaculata</i> (Heckel)	Veracruz, México	Salgado-Maldonado et al. (2014)
	M	§ <i>Petenia splendida</i> Günther	Hidalgo, México	Salgado-Maldonado et al. (2005), Pérez-Ponce de Leon et al. (2007)
	M	× <i>Rhamdia guatemalensis</i> (Günther)	Hidalgo, México	Salgado-Maldonado et al. (2005), Pérez-Ponce de Leon et al. (2007)
	M	* <i>Poecilia mexicana</i> Steindachner	Hidalgo, México	Salgado-Maldonado et al. (2004, 2005), Pérez-Ponce de Leon et al. (2007)
	M	* <i>Poeciliopsis gracilis</i> (Heckel)	Hidalgo, México	Salgado-Maldonado et al. (2005), Pérez-Ponce de Leon et al. (2007)
	M	‡ <i>Tampichthys ipni</i> (Alvarez & Navarro)	Hidalgo, México	Salgado-Maldonado et al. (2004), Pérez-Ponce de Leon et al. (2007)
	M	§ <i>Vieja fenestrata</i> (Günther)	Hidalgo, México	Salgado-Maldonado et al. (2005), Pérez-Ponce de Leon et al. (2007)
M	* <i>Xiphophorus hellerii</i> Heckel	Hidalgo, México	Salgado-Maldonado et al. (2005), Pérez-Ponce de Leon et al. (2007)	

**Tabela 7. (continuação)**

<b>Espécies</b>	<b>E</b>	<b>Espécie do hospedeiro</b>	<b>País de origem</b>	<b>Referências</b>
	M	* <i>Xiphophorus</i> sp.	Hidalgo, México	Salgado-Maldonado et al. (2004), Pérez-Ponce de Leon et al. (2007)
<i>Uvulifer batesi</i> Achatz, Curran, Patitucci, Fecchio e Tkach, 2019	A	† <i>Chloroceryle inda</i> (Linnaeus)	Peru	Achatz et al. (2019b)
<i>Uvulifer elongatus</i> Dubois, 1988	A	† <i>Megaceryle torquata</i> Linnaeus	Paraguai	Dubois (1988), Fernandes et al. (2015)
	A	† <i>Megaceryle torquata</i>	Amazonas e Pantanal, Brasil	Achatz et al. (2019b)
<i>Uvulifer pequenae</i> Achatz, Curran, Patitucci, Fecchio e Tkach, 2019	A	† <i>Chloroceryle inda</i>	Peru	Achatz et al. (2019b)
<i>Uvulifer prosocotyle</i> (Lutz, 1928)	A	† <i>Megaceryle torquata</i>	Brasil	Travassos et al. (1969); Fernandes et al. (2015)
	A	† <i>Megaceryle torquata</i>	Pantanal, Brasil	Achatz et al. (2019b)
	A	† <i>Chloroceryle amazona</i> (Latham)	Venezuela	Dubois (1938a), Yamaguti (1971), Fernandes et al. (2015)
<i>Uvulifer spinatus</i> López-Jiménez, Perez-Ponce de Leon & Garcia-Varela, 2018	A	† <i>Chloroceryle americana</i> (Gmelin)	Hidalgo, San Luis Potosi, Oaxaca, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	* <i>Alfaro cultratus</i> (Regan)	Nicarágua	López-Jiménez et al. (2017)
	M	* <i>Alfaro huberi</i> (Folwer)	Honduras	López-Jiménez et al. (2017)
	M	* <i>Heterandria</i> sp.	Guatemala	López-Jiménez et al. (2017)
	M	* <i>Poecilia formosa</i> (Girard)	San Luis Potosi, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	* <i>Poecilia gracilis</i> Valenciennes	Presa los Ocotes, Oaxaca, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	* <i>Poecilia mexicana</i> Steindachner	Hidalgo e San Luis Potosi, México	Achatz et al. (2019b)
	M	* <i>Poecilia mexicana</i>	Nicarágua	López-Jiménez et al. (2017)
	M	* <i>Poecilia sphenops</i> Valenciennes	Rio Cuilapam, Oaxaca, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	* <i>Poecilia gracilis</i>	Presa los Ocotes, Oaxaca, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	* <i>Poeciliopsis occidentalis</i> (Baird & Girard)	Sonora, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	* <i>Poeciliopsis</i> sp.	Sonora, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	° <i>Profundulus oaxacae</i> (Meek)	Oaxaca, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	* <i>Xiphophorus cortezi</i> Rosen	Hidalgo, México	López-Jiménez et al. (2017)



**Tabela 7. (continuação)**

<b>Espécies</b>	<b>E</b>	<b>Espécie do hospedeiro</b>	<b>País de origem</b>	<b>Referências</b>
	M	* <i>Xiphophorus helleri</i> (Heckel)	Oaxaca, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	* <i>Xiphophorus malinche</i> Rauchenberger, Kallman & Morizot	Hidalgo, México	López-Jiménez et al. (2017)
<i>Uvulifer weberi</i> Dubois, 1985	A	† <i>Chloroceryle amazona</i>	Paraguai	Dubois (1985, 1988), Fernandes et al. (2015)
	A	† <i>Chloroceryle inda</i> (Linnaeus)	Paraguai	Dubois (1985, 1988), Fernandes et al. (2015)
	A	† <i>Chloroceryle americana</i>	Paraguai	Dubois (1985, 1988), Fernandes et al. (2015)
	A	† <i>Chloroceryle americana</i>	Pantanal, Brasil	Achatz et al. (2019b)
<i>Uvulifer</i> sp. Linhagem 1	A	† <i>Megaceryle alcyon</i> (Linnaeus)	Hidalgo, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	‡ <i>Astyanax mexicanus</i> (De Filippi)	San Luis Potosi, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	‡ <i>Gila</i> sp.	Sonora, México	López-Jiménez et al. (2017)
<i>Uvulifer</i> sp. Linhagem 2	M	♂ <i>Archocentrus centrarchus</i> Gill & Bransford	Nicarágua	López-Jiménez et al. (2017)
	M	♂ <i>Herichthys cyanoguttatus</i> Baird & Girard	San Luis Potosi, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	♂ <i>Herichthys labridens</i> (Pellegrin)	Hidalgo, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	♂ <i>Hypsophrys nematopus</i> Günther	Costa Rica	López-Jiménez et al. (2017)
	M	♂ <i>Hypsophrys</i> sp.	Nicarágua	López-Jiménez et al. (2017)
	M	♂ <i>Thorichthys</i> sp.	Honduras	López-Jiménez et al. (2017)
<i>Uvulifer</i> sp. Linhagem 3	M	♂ <i>Cichlasoma istlanum</i> (Jordan & Snyder)	Jalisco, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	♂ <i>Amatitlania nigrofasciata</i> (Günther)	Morelos, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	♂ <i>Amatitlania siquia</i> Schmitter-Soto	Nicarágua	López-Jiménez et al. (2017)
	M	♂ <i>Cibroheros longimanus</i> (Günther)	Nicarágua	López-Jiménez et al. (2017)
	M	♂ <i>Herichthys cyanoguttatus</i>	San Luis Potosi, México	López-Jiménez et al. (2017)
	M	♂ <i>Thorichthys</i> sp.	Honduras	López-Jiménez et al. (2017)

*Abreviações:* E, Estágio do ciclo de vida; A, adulto; M, metacercária. *Símbolos para ordem e família do hospedeiro:* ‡Characiformes: Characidae; †Coraciiformes: Alcedinidae; \*Cyprinodontiformes: Poeciliidae; °Cyprinodontiformes: Pofundulidae; †Cypriniformes: Cyprinidae; ΦMugiliformes: Mugilidae; ♂Cichliformes: Cichlidae; ‡Cichliformes: Eleotridae; ×Siluriformes: Heptapteridae

Enquanto este gênero é tido como específico à família Alcedinidae como hospedeiro definitivo, a especificidade é ainda discutida para os outros estágios de vida. Contrastando com a espécie considerada generalista *U. ambloplitis*, pode ser visto na tabela 7 a frequente presença de metacercárias em determinadas famílias de peixes, principalmente poecilídeos e ciclídeos. A especificidade ao segundo hospedeiro intermediário ao que parece tende a especificidade, embora seja um fator ainda em discussão (LÓPEZ-JIMENEZ et al. 2017). Subair et al. (2013), por exemplo, sugeriu especificidade de *U. iruvettiensis* ao hospedeiro em estágios de cercária, metacercária e adulto. López-Jimenez et al. (2017) reforça a hipótese quanto a metacercárias ao afirmar que há uma aparente predileção destas a determinadas famílias de hospedeiros, sugerindo que esta propensão pudesse estar relacionada mais a compatibilidade fisiológica do que a fatores ecológicos. Ainda segundo López-Jiménez et al. (2017), as metacercárias provenientes do México relatadas na literatura apresentaram-se grande parte em duas famílias de hospedeiros, isto é, 40% em ciclídeos e 19% em poecilídeos; em sua pesquisa duas espécies com grande distribuição geográfica foram identificadas exclusivamente em ciclídeos. No presente estudo ambas espécies de *Uvulifer* aqui analisadas foram coletadas na mesma localidade em que foi identificado a presença de cistos enegrecidos na cabeça, pele, musculatura e nadadeiras de diferentes espécies de peixe da família Cichlidae, acometendo 31% dos ciclídeos analisados na região, entretanto não conseguimos amplificar o material genético de todos estes para identificação, portanto, não foram incluídos no presente estudo. Cabe a nota da presença da doença dos pontos pretos em ciclídeos no rio Jari no estado do Amapá.

Ambos gêneros abordados no presente estudo são conhecidos como causadores da doença dos pontos pretos em peixes. Embora existam diversos registros da doença dos pontos pretos nas Américas (CARVALHO et al. 2008; FLORES-LOPEZ et al. 2014; SHAAF et al. 2017), o conhecimento sobre os causadores ainda é escasso. Alguns estudos não identificam ou descrevem o agente causador, muitos carecem de estudos morfológicos detalhados das metacercárias, por vezes com identificações a nível de espécie duvidosas como mencionado por López-Jiménez et al. (2017), além de uma possível generalização da espécie *U. ambloplitis* citada por López-Jiménez et al. (2017) e Achatz et al. (2019b).

Diferente de *Uvulifer*, *Posthodiplostomum* frequentemente é encontrado na região interna de peixes, afetando diferentes órgãos, até mesmo os olhos. Sabe-se que diferentes espécies do gênero afetam de formas distintas os hospedeiros intermediários, por exemplo, *Posthodiplostomum minimum*, conhecido como “verme branco”, afeta os órgãos internos com cistos não melanizados (WOO et al., 2006; BOONE et al. 2018), enquanto que

*Posthodiplostomum cuticola* (Nordmann, 1832) geralmente é encontrado na pele, nadadeira e musculatura, estando frequentemente associado a doença dos pontos pretos (ZRNČIĆ et al. 2009; ONDRAČKOVÁ et al. 2004; HAMOUDA et al. 2019). Nenhum espécime de *Posthodiplostomum* foi, por nós, encontrado em regiões externas ou em cistos enegrecidos.

Estudos integrativos que incorporam dados moleculares e experimentais à análises morfológicas são considerados ideais para identificar trematoda em estágio de metacercária a nível de espécie. Entretanto grande parte dos estudos presentes na região analisada não utilizam destas abordagens, fator que justifica a ausência de identificação em parte da literatura. Embora existam diferentes relatos de *Posthodiplostomum* na América do Sul, somente recentemente López-Hernández et al. (2018) publicaram o único dado molecular para a região na qual incorporaram dados morfológicos, moleculares e experimentais para compreensão do ciclo de vida de *Posthodiplostomum nanum* no Brasil. Grande parte dos estudos moleculares sobre o gênero provém da América do Norte, Europa e Ásia (LOCKE et al., 2010a; MOSZCZYNSKA et al., 2009; NGUYEN et al., 2012; STONAYOV et al., 2017). Outra dificuldade na identificação que levam muitos destes estudos a não resultarem em espécies nomeadas parte da falta de sequências moleculares referentes à espécimes adultos que permitam a associação de diferentes estágios de desenvolvimento. Este fator é claramente visto em grande parte das espécies do presente estudo, na qual a identificação de algumas espécies em estágio de metacercária foi possibilitada apenas pela inclusão de dados moleculares para espécimes em estágio adulto, visto que nenhuma das sequências por nós geradas apresentou similaridade o suficiente com espécies previamente sequenciadas que permitissem a identificação.

Grande parte dos estudos referentes ao gênero *Uvulifer* é relativo à patologia por ele causada, outros tanger estudos experimentais para conhecimento do ciclo de vida, além da própria taxonomia, principalmente de espécimes adultos, entretanto podemos identificar uma lacuna no que se refere à estudos moleculares. Devemos ressaltar que somente seis trabalhos extremamente recentes fizeram algum acréscimo de dado molecular ao grupo no mundo, estes são: Hernández-Mena et al. (2017), Blasco-Costa et al. (2017), López-Jiménez et al. (2017), Hoogendoorn et al. (2019), Achatz et al. (2019b), Heneberg et al. (2020).

Mediante as análises das Tabelas 6 e 7, podemos perceber que grande parte das espécies conhecidas de ambos gêneros apresentam somente o estágio adulto conhecido. Considerando ainda que muitos dos registros de metacercárias não incluem qualquer dado morfológico, fica perceptível que há uma grande lacuna quanto a morfologia e evolução dos estágios larvais. Embora dados moleculares sejam de grande importância para a identificação dos estágios

larvais, alguns trabalhos que por meio de análises moleculares identificaram espécimes a nível de gênero não apresentaram qualquer dado morfológico para futuras comparações como Locke et al. (2010b) e López-Jimenez et al. (2017). Segundo Selbach et al. (2015) e Blasco-Costa et al. (2017) integrar diferentes metodologias é o ideal ao estudar diplostomídeos, principalmente em estágios larvais. Podemos citar *Uvulifer ambloplitis* como um bom exemplo da lacuna de conhecimento existente, diferente de todas espécies descritas para o grupo, a espécie é considerada generalista (SALGADO-MALDONADO et al., 2014) uma vez que foi registrada em ao menos sete famílias de peixes somente no México e diversas famílias no Canadá e Estados Unidos. Considera-se que a ausência de dados morfológicos detalhados, além da distribuição generalizada em peixes tornem duvidosas as identificações a nível de espécie destas metacercárias (LÓPEZ-JIMENEZ et al., 2017). López-Jimenez et al. (2017) e Achatz et al. (2019b) consideram que detalhados dados morfológicos aliados com dados moleculares são essenciais para a compreensão da hipótese de especificidade ao hospedeiro, delimitação de espécie e conhecimento do ciclo biológico. Tendo como base a escassez de conhecimento sobre o ciclo de vida, os poucos estudos moleculares, a falta de dados morfológicos em parte dos relatos, a possível generalização por parte de pesquisadores da espécie *U. ambloplitis* torna-se proeminente e se reforça a necessidade de análises integrativas de forma a permitir o fornecimento de dados mais robustos.

Recentes publicações discutem o atual status da família Diplostomidae devido ao caráter parafilético apresentado e as metacercárias apresentarem morfotipos distinguíveis isto é, ‘neascus’ para subfamília Crassiphialinae e ‘diplostomulum’ para outros membros da família (BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017; HERNÁNDEZ-MENA et al., 2017; LOCKE et al., 2018). Locke et al. (2018) afirma que a visão de que metacercárias fornecem caracteres pouco informativos filogeneticamente parece não condizer com membros da superfamília Diplostomoidea. Esta afirmação está de acordo com nossos resultados (ambos capítulos) que reforça ainda a ideia de Locke et al. (2018) de que há caracteres que se mostram filogeneticamente conservados como os locais de infecção, hábito de encistamento e tipo de cisto e podem servir como aliados em análises filogenéticas.

O presente estudo reforça uma das modificações sugeridas para a atual status da família, isto é, que a subfamília Crassiphialinae deva ser elevada a nível de família. Para que tal mudança ocorra é necessário a inclusão de dados moleculares de outros representantes da família Diplostomidae e do gênero tipo de Crassiphialinae, *Crassiphiala* Van Haitsma, 1925 (BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017; HERNÁNDEZ-MENA et al., 2017; LOCKE et al.,

2018). De acordo com Hernández-Mena et al. (2017), tal alteração incluiria à nova família metacercárias do tipo ‘neascus’, isto é, os gêneros *Uvulifer*, *Posthodiplostomum*, *Ornithodiplostomum* e possivelmente outros 11 gêneros. Diferente da grande maioria dos estudos, Achatz et al. (2019a) não concordam com a elevação da subfamília e consideram que posterior a uma revisão apenas *Crassiphiala* e *Uvulifer* devam permanecer na subfamília. O consenso é da necessidade de reavaliação, sendo necessária uma amostragem mais ampla de táxons para que ocorram alterações taxonômicas.

No capítulo anterior, através da grande amostragem de Diplostomoidea analisada pudemos demonstrar que a subfamília apresentou caráter monofilético, agrupando em dois subclados monofiléticos assim como sugerido por Achatz et al. (2019a), isto é, (i) um clado composto pelos gêneros *Uvulifer* + *Crassiphiala* (clado 1) e (ii) um clado composto por *Bolbophorus* + *Posthodiplostomum* + *Ornithodiplostomum* (clado 2). Estes clados se mantiveram nas análises voltadas à subfamília apresentadas no presente capítulo. Em uma possível alteração na classificação desta subfamília, consideramos que estes clados podem ser distinguidos também pelos critérios da especificidade ao hospedeiro adulto e a distribuição da vitelária, isto é, clado 1 com parasitos de Alcedinidae, apresentando vitelária restrita ao segmento posterior e clado 2 com parasitos de Pelecaniformes e Ardeae com vitelária em ambos segmentos. Quanto ao estágio de metacercária esta divisão se mantém, com ambos clados diferenciados ainda pelo que consideramos serem subtipos de ‘neascus’, isto é, (i) clado 1 com cistos de várias camadas e pigmentados e (ii) clado 2 com metacercária com cisto finos e transparente. O presente estudo suporta, portanto, a elevação de Crassiphialinae a nível de família e sugere que mediante dados moleculares e morfológicos deva-se manter a divisão dos clados 1 e 2 como subfamílias.

O gênero *Bolbophorus*, a exceção dos outros membros da atual subfamília, foi recuperado de forma mais inconsistente nas árvores filogenéticas, geralmente com baixo suporte. Na literatura assim como no presente estudo, o gênero é recuperado junto aos outros membros Crassiphialinae, geralmente como basal à *Posthodiplostomum* (HERNÁNDEZ-MENA et al. 2017; BLASCO-COSTA & LOCKE, 2017; ACHATZ et al. 2019a; HOOGENDOORN et al. 2019). Diferente dos outros membros de Crassiphialinae o gênero apresenta o tipo morfológico ‘prodiplostomum’ de metacercária com cistos transparentes e de camada fina. Assim como na literatura, nossos resultados demonstram que *Bolbophorus* deva se manter junto aos outros membros de Crassiphialinae, entretanto é necessário a incorporação de mais dados para melhor compreensão do grupo.

A elucidação parcial do ciclo de vida de algumas espécies aqui descritas foi possibilitada pela correspondência de sequências moleculares. Para uma descrição definitiva das espécies aqui analisadas somente em estágio de metacercária são necessárias novas amostragens de possíveis hospedeiros definitivos visando obter uma maior diversidade de espécimes adultos. Somente através do sequenciamento e exame morfológico de uma diversidade de espécimes adultos, principalmente da região, será possível identificar definitivamente as metacercárias aqui analisadas.

O presente estudo amplia o conhecimento referente às espécies dos gêneros *Posthodiplostomum* e *Uvulifer*, apresentando tanto dados morfológicos quanto os primeiros dados moleculares de metacercárias na América do Sul para ambos, reafirmando a necessidade do uso da taxonomia integrativa de forma a possibilitar futuras comparações com dados mais robustos.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

- O conhecimento sobre a diversidade de trematódeos na região neotropical ainda é reduzido, tendo em vista os presentes resultados, a potencial fauna de hospedeiros e extensão da região.
- Grande parte da literatura referente a diversidade de trematódeos no Brasil tem como material de estudo parasitos em estágio adulto, ignorando a importância do conhecimento sobre estágios larvais, além da perda econômica por eles gerada, demonstrando desconhecimento do ciclo de vida e por conseguinte sua interrelação com o ambiente e hospedeiros. O presente estudo demonstrou que apesar de metacercárias apresentarem poucos caracteres de diferenciação, a incorporação de dados morfológicos deste estágio é essencial, possibilitando um aumento substancial de conhecimento aos grupos.
- Foi revalidado o tipo ‘*proterodiplostomulum*’ de metacercária e torna-se necessário a reavaliação dos morfotipos de metacercária atualmente reconhecidos levando em consideração, é claro, uma metodologia integrativa.
- A sistemática de Diplostomidae e Strigeidae, como atualmente reconhecida, parece insatisfatória e exige uma nova revisão dos grupos e divisões a nível familiar e subfamiliar, o que proporcionará uma melhor compreensão da biologia e evolução desses parasitos.
- A utilização de uma abordagem taxonômica integrativa mostra-se essencial ao analisar estágios larvais, possibilitando não somente uma identificação mais robusta, mas também a associação de diferentes estágios do ciclo de vida, a comparação de estágios larvais de forma mais consistente, permitindo o delineamento de informações como especificidade, distribuição geográfica, entre outros.
- A carência de dados moleculares junto a descrições inadequadas impede o progresso do conhecimento sobre a biodiversidade de trematódeos.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, V. D.; AZEVEDO, R. K.; LUQUE, J. L. Ecologia da comunidade de metazoários parasitos do tamboatá *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) (Siluriformes: Callichthyidae) do Rio Guandu, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 28, p. 413–419, 2006.

ABRAMOFF, M. D.; MAGELHAES, P. J.; RAM, S. J. “Image processing with ImageJ”. **Biophotonics International**, v. 11, p. 36–42, 2004.

ACHATZ, T. J.; PULIS, E. E.; FECCHIO, A.; SCHLOSSER, I. J.; TKACH, V. V. Phylogenetic relationships, expanded diversity and distribution of *Crassiphiala* spp. (Digenea, Diplostomidae), agents of black spot disease in fish. **Parasitology research**, v. 118, n. 10, p. 2781–2787, 2019a.

ACHATZ, TYLER J.; CURRAN, S. S.; PATITUCCI, K. F.; FECCHIO, A.; TKACH, V. V. Phylogenetic affinities of *Uvulifer* spp. (Digenea: Diplostomidae) in the Americas with description of two new species from Peruvian Amazon. **Journal of Parasitology**, v. 105, n. 5, p. 704–717, 2019b.

ADLARD, R. D.; MILLER, T. L.; SMIT, N. J. The butterfly effect: parasite diversity, environment, and emerging disease in aquatic wildlife. **Trends in Parasitology**, v. 31, p. 160–166, 2015.

AGUILAR-AGUILAR, R.; SALGADO-MALDONADO, G.; MORENO-NAVARRETE, R. G.; CABAÑAS-CARRANZA, G. **Helminths parasitos de peces dulceacuícolas**, p. 261–270. In: LUNA, I.; MORRONE, J. J.; ESPINOSA, D. (Eds), *Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental*. Las Prensas de Ciencias, Mexico City. 2004.

ALBERT, J. S.; REIS, R. E. **Historical biogeography of neotropical freshwater fishes**. Berkeley and Los Angeles, California. University of California Press; 2011. p. 424.

ALVAREZ, A.; LENIS, C.; VELEZ, I. First report of two species of trematodes (Digenea: Proterodiplostomidae) for Colombia in *Caiman crocodylus fuscus* (Reptilia: Crocodylia). **Caldasia**, v. 27, p. 287–291, 2005.

AMUNDSEN, P-A; LAFFERTY, K. D.; KNUDSEN, R.; PRIMICERIO, R.; KLEMETSEN, A.; KURIS, A. M. Food web topology and parasites in the pelagic zone of a subarctic lake. **Journal of Animal Ecology**, v. 78, p. 563–572, 2009.

AZEVEDO, R. K.; ABDALLAH, V. D.; LUQUE, J. L. Ecologia da comunidade de metazoários parasitos do acará *Geophagus brasiliensis* (Quoy e Gaimard, 1824) (Cichliformes: Cichlidae) do rio Guandu, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, n. 4, p. 403–411, 2006.

AZEVEDO, R. K.; ABDALLAH, V.; LUQUE, J. Acanthocephala, Annelida, Arthropoda, Myxozoa, Nematoda and Platyhelminthes parasites of fishes from the Guandu river, Rio de Janeiro, Brasil. **Check List**, v. 6, p. 659, 2010.



- BERNARDON, F. F.; VALENTE, A. L.; MÜLLER, G. Scientific Note Gastrointestinal helminths of the Argentine side-necked turtle, *Phrynops hilarii* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines, Chelidae), in south Brasil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 8, p. 55–57, 2013.
- BLASCO-COSTA, I.; LOCKE, S. A. Life history, systematics and evolution of the Diplostomoidea Poirier, 1886: progress, promises and challenges emerging from molecular studies. **Advances in Parasitology**, v. 98, p. 167–225, 2017.
- BOONE, E. C.; LAURSEN, J. R.; COLOMBO, R. E.; MEINERS, S. J.; ROMANI, M. F.; KEENEY, D. B. Infection patterns and molecular data reveal host and tissue specificity of *Posthodiplostomum* species in centrarchid hosts. **Parasitology**, v. 145, p. 1458–1468, 2018.
- BOWLES, J.; BLAIR, D.; MCMANUS, D. P. A molecular phylogeny of the human schistosomes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 4, p. 103–109, 1995.
- BRABEC, J.; KOSTADINOVA, A.; SCHOLZ, T.; TIMOTHY, D.; LITTLEWOOD, J. Complete mitochondrial genomes and nuclear ribosomal RNA operons of two species of *Diplostomum* (Platyhelminthes: Trematoda): a molecular resource for taxonomy and molecular epidemiology of important fish pathogens. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 336, 2015.
- BRANDÃO, M.; LUQUE, J. L.; SCHOLZ, T.; KOSTADINOVA, A. New records and descriptions of digeneans from the Magellanic penguin *Spheniscus magellanicus* (Forster) (Aves: Sphenisciformes) on the coast of Brasil. **Systematic parasitology**, v. 85, n. 1, p. 79–98, 2013.
- BROOKS, D. R.; CATTO, J. B.; AMATO, F. R. A new phylogenetic classification of the genera of the Proterodiplostomatidae Dubois, 1936 (Digenea: Strigeiformes). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 105, p. 143–147, 1992.
- BULLARD, S. A.; OVERSTREET R. M. Digeneans as enemies of fishes. **Fish diseases**, v. 2 p. 815–974, 2008.
- CARVALHO, A. R.; TAVARES, L. E. R.; LUQUE, J. L. Metacercárias de *Neascus* sp. em *Geophagus brasiliensis* (Cichliformes: Cichlidae) do rio do Peixe, Juiz de Fora, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 30, n. 3, p. 315–320, 2008.
- CARVALHO, A. R.; TAVARES, L. E.; LUQUE, J. L. Variação sazonal dos metazoários parasitos de *Geophagus brasiliensis* (Cichliformes: Cichlidae) no rio Guandu, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 2, p. 159–167, 2010.
- CARVALHO, A. R.; AZEVEDO, R. K.; ABDALLAH, V. D.; LUQUE, J. L. Metacercárias de Diplostomidae (Digenea: Diplostomoidea) em *Geophagus brasiliensis* (Cichliformes: Cichlidae) do rio Guandu, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 2, p. 233–239, 2012.
- CATTO, J. B.; AMATO, J. F. R. Proterodiplostome parasites (Digenea, Proterodiplostomidae) of the Caiman, *Caiman crocodilus yacare* (Reptilia, Crocodylia) in the Pantanal Mato-Grossense, Brasil, with the description of two new species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 539–551, 1994a.

CATTO, J. B.; AMATO, J. F. R. Helminth community structure of the caiman, *Caiman crocodilus yacare* (Crocodyla, Alligatoridae) in the Brazilian Pantanal. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, p. 109–118, 1994b.

CECH, G.; SÁNDOR, D.; MOLNÁR, K.; PAULUS, P.; PAPP, M.; PREISZNER, B.; VITÁL, Z.; VARGA, A.; SZÉKELY, C. New record of metacercariae of the North American *Posthodiplostomum centrarchi* (Digenea, Diplostomidae) in pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) in Hungary. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 68, n. 1, 2020.

CHOUHDURY, A.; AGUIRRE-MACEDO, M. L.; CURRAN, S. S.; OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M.; OVERSTREET, R. M.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; PORTES SANTOS, C.; Trematode diversity in freshwater fishes of the Globe II: ‘New World.’ **Systematic Parasitology**, v. 93, p. 271–282, 2016.

CHOUHDARY, K.; TRIPATHI, A.; PANDEY, K. C.; AGRAWAL, N. Morphological and molecular characterisation of three Indian Neascus-type metacercariae (Digenea: Diplostomidae). **Parasitology international**, v. 66, n. 5, p. 652–659, 2017.

CHOUHDARY, K.; RAY, S.; PANDEY, K. C.; AGRAWAL, N. Morphological and molecular characterization of six Indian Tetracotyle type metacercariae (Digenea: Strigeidae Railliet, 1919), using ribosomal and mitochondrial DNA. **Parasitology international**, v. 70, p. 33–40, 2019.

CONROY, G. A.; CONROY, G. *Crocodicola pseudostoma* (Trematoda: Proterodiplostomatidae), endoparasite of the pimelodid catfish *Rhamdia hilarii*, in Sao Paulo State, Brasil. **Revista Iberica de Parasitologia**, v. 46, p. 35–38, 1986.

CRIBB, T. H.; BRAY, R. A.; LITTLEWOOD, D. T. J.; PICHELIN, S. P.; HERNIOU, E. A. The Digenea. In: LITTLEWOOD, D. T. J.; BRAY, R. A. (Eds.), **Interrelationships of the Platyhelminthes**, Taylor and Francis, London, p. 168–185, 2001.

CROTTI, M. Digenetic Trematodes: an existence as parasites. Brief general overview. **Microbiologia médica**, v. 28, n. 2, 2013.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, p. 772, 2012.

DIAZ-UNGRÍA, C. Endoparasitic helminths of Venezuela. **Ciencia e Veterinaria**, v. 3, p. 37–242, 1973.

DIGIANI, M. C. Digeneans and cestodes parasitic in the white-faced ibis *Plegadis chihi* (Aves: Threskiornithidae) from Argentina. **Folia Parasitologica**, v. 47, n. 3, p. 195–204, 2000.

DINIZ, J. A. F.; RANGEL, T.; BINI, L. M.; HAWKINS, B. A. Macroevolutionary dynamics in environmental space and the latitudinal diversity gradient in New World birds. **Proceedings of the Royal Society: Biological**, v. 274, p. 43–52, 2007.

- DOBSON, A.; LAFFERTY, K. D.; KURIS, A. M. Homage to Linnaeus: how many parasites? How many hosts? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 11482–11489, 2008.
- DRAGO, F. B.; LUNASCHI, L. I. Digéneos parásitos de aves Ciconiiformes de Argentina. **Revista mexicana de biodiversidad**, v. 82, n. 1, p. 77–83, 2011.
- DUBOIS, G. Nouveaux principes de classification des Trématodes du groupe des Strigeida (Notes préliminaires). **Revue Suisse de Zoologie**, 43, p. 507–515, 1936a.
- DUBOIS, G. Les diplostomes de reptiles (Trematoda: Proterodiplostomidae nov. fam.) du Musée de Vienne. **Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles**, v. 61, p. 5–80, 1936b.
- DUBOIS, G. Sur quelques strigéidés. **Revue Suisse de Zoologie**, v. 44, p. 391–396, 1937.
- DUBOIS, G. **Liste systematique des Strigeides du Bresil et du Venezuela**, p. 145–156. In : Livro Jubilar do Professor Lauro Travassos, Rio de Janeiro: Typographia do Instituto Oswaldo Cruz. 1938a.
- DUBOIS, G. Monographie des Strigeida (Trematoda). **Memoires de la Societe Neuchateloise des Sciences Naturelles**, v. 6, p. 1–535, 1938b.
- DUBOIS, G. A propos de la specificite parasitaire des Strigeida. **Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles**, v. 69, p. 5–103, 1944.
- DUBOIS, G. Sur trois diplostomes de crocodiliens (Trematoda: Strigeida). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 23, p. 5–13, 1948.
- DUBOIS, G. Systematique des Strigeida. Comple-ment de la monographie. **Mémoires de la Société Neuchateloise des Sciences Naturelles**, v. 8, p. 1–141, 1953.
- DUBOIS, G. Synopsis des Strigeidae et des Diplostomidae (Trematoda). **Mémoires de la Société des Sciences Naturelles de Neuchâteloise**, v. 10, p. 1–258, 1968.
- DUBOIS, G. Les Strigeata (Trematoda) de la collection A. Lutz. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 68, p. 169–196, 1970a.
- DUBOIS, G. Revision des Proterodiplostomatidae Dubois, 1936 (Trematoda: Strigeata). **Anales del Instituto de Biologia de la Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Zoologia**, v. 41, p. 51–59, 1970b.
- DUBOIS, G. Helminthological notes IV: Strigeidae Railliet, Diplostomidae Poirier, Proterodiplostomidae Dubois and Cyathocotylidae Poche (Trematoda) (author's transl). **Revue Suisse De Zoologie: Annales De La Société Zoologique Suisse Et Du Muséum D'histoire Naturelle De Genève**, v. 85, p. 607–615, 1978.
- DUBOIS, G., Révision et nouvelle clé de détermination des Diplostomes de Reptiles (Trematoda: Proterodiplostomidae Dubois, 1936). **Bulletin de la Société des science naturelles de Neuchâtel**, v. 102, p. 48, 1979.

DUBOIS, G. Quelques Strigeoidea (Trematoda) recoltés chez des oiseaux du Paraguay par la Mission Claude Weber, automne 1983, du Museum d'Histoire naturelle de Genève. **Revue Suisse Zoology**, v. 92, p. 641–648, 1985.

DUBOIS, G. Rediscovery of a neotropical Ophiodiplostomine-*Heterodiplostomum lanceolatum* Dubois, 1936 (Trematoda: Strigeata; Proterodiplostomatidae). **Revue Suisse de Zoologie**, v. 93, p. 247–248, 1986.

DUBOIS, G. Quelques strigeoïdes (Trematoda) recoltés au Paraguay par les expéditions du Museum d'Histoire naturelle de Genève au cours des années, 1979, 1982 et 1985. **Revue Suisse de Zoologie**, v. 95, p. 521–532, 1988.

DUELLMAN, W. E. The herpetofauna of the Andes: Patterns of distribution, origin, differentiation, and present communities. In: DUELLMAN, W.E. (Ed.), **The South American Herpetofauna: Its Origin, Evolution, and Dispersal. Museum of Natural History VII. University of Kansas, Lawrence**, pp. 371–459, 1979.

FERNANDES, B. M. M.; JUSTO, M. C. N.; CÁRDENAS, M. Q.; COHEN, S. C. **South american trematodes parasites of birds and mammals**. Oficina de Livros, Rio de Janeiro: Biblioteca de Ciências Biomédicas. ICICT. Fiocruz–RJ, 2015.

FERNANDES, B. M. M.; KOHN, A. **South American trematodes parasites of amphibians and reptiles**. Oficina de Livros, Rio de Janeiro. 2014. 225 p.

FERRARI-HOEINGHAUS, A. P., TAKEMOTO, R. M., PAVANELLI, G. C., Digeneic trematode parasites of *Loricariichthys platymetopon* (Loricariidae, Siluriformes) of the upper Paraná river floodplain, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 29, p. 327–329, 2007.

FLORES-LOPES, F. The occurrence of black spot disease in *Astyanax aff. fasciatus* (Characiformes: Characidae) in the Guaíba Lake basin, RS, Brasil. **Brasilian Journal of Biology**, v. 74, n. 3, p. 127–134, 2014.

FRAIJA-FERNÁNDEZ, N.; OLSON, P. D.; CRESPO, E. A.; RAGA, J. A.; AZNAR, F. J.; FERNANDEZ, M. Independent host switching events by digenean parasites of cetaceans inferred from ribosomal DNA. **International Journal for Parasitology**, v. 45, p. 167–173, 2015.

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

GALAKTIONOV, K. V.; DOBROVOLSKIJ, A. A. **The biology and evolution of trematodes**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda. 2003. 592 p.

GEORGIEVA, S.; SOLDÁNOVÁ, M.; PÉREZ-DEL-OLMO, A.; DANGEL, D. R.; SITKO, J.; SURES, B.; KOSTADINOVA, A. Molecular prospecting for European *Diplostomum*

(Digenea: Diplostomidae) reveals cryptic diversity. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 1, p. 57–72, 2013.

GIBSON, D. I. Questions in digenean systematics and evolution. **Parasitology**, v. 95, n. 2, p. 429–460, 1987.

GIBSON, D. I. Trematoda. In: MARGOLIS, L. & KABATA, Z. (Eds.). Guide to the parasites of fishes of Canada. Part IV. **Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences**, 124, 1996. 363 p.

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

GUIDELLI, G. M.; ISAAC, A.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. Endoparasite infracommunities of *Hemisorubim platyrhynchos* (Valenciennes, 1840) (Pisces: Pimelodidae) of the composition and ecological aspects. **Brasilian Journal of Biology**, v. 63, p. 261–268, 2003.

GUIDELLI, G.; TAVECHIO, W. L. G.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. Fauna parasitária de *Leporinus lacustris* e *Leporinus friderici* (Characiformes, Anostomidae) da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 281–290, 2006.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J. F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, p. 307–321, 2010.

HAMOUDA, A. H.; BAZH, E. K. A. First report of *Posthodiplostomum minimum* metacercariae and resulting histopathological changes in *Bagrus bajad* from Lake Nasser, Egypt. **Journal of parasitic diseases**, v. 43, n. 1, p. 14–21, 2019.

HECHINGER, R. F.; LAFFERTY, K. D.; KURIS, A. M. Trematodes Indicate Animal Biodiversity in the Chilean Intertidal and Lake Tanganyika. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 966–968, 2008.

HENEBERG, P.; SITKO, J.; TĚŠÍNSKÝ, M. Paraphyly of *Conodiplostomum* Dubois, 1937. **Parasitology International**, v. 76, p. 102033, 2020.

HERNÁNDEZ-MENA, D. I.; GARCÍA-VARELA, M.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G. Filling the gaps in the classification of the Digenea Carus, 1863: systematic position of the Proterodiplostomidae Dubois, 1936 within the superfamily Diplostomoidea Poirier, 1886, inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Systematic Parasitology**, v. 94, n. 8, p. 833–848, 2017.

HOOGENDOORN, C.; SMIT, N. J.; KUDLAI, O. Molecular and morphological characterisation of four diplostomid metacercariae infecting *Tilapia sparrmanii* (Cichliformes: Cichlidae) in the North West Province, South Africa. **Parasitology research**, v. 118, n. 5, p. 1403–1416, 2019.

HORÁK, P.; BULANTOVÁ, J.; MIKEŠ, L. Schistosomatoidea and Diplostomoidea. In: TOLEDO, R.; FRIED, B. (Eds.) **Digenetic Trematodes**. Springer, Cham, 2019. p. 217–254.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F.; NIELSEN, R.; BOLLBACK, J. P. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science** v. 294, p. 2310–2314, 2001.

HUGHES, R. C. Studies on the trematode family Strigeidae (Holostomidae) No. VI. A new metacercaria, *Neascus ambloplitis* sp. nov. representing a new larval group. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 46, p. 248–267, 1927.

HUGHES, R. C.; HIGGINBOTHAM, J. W.; CLARY, J. W. The trematodes of reptiles, part I, systematic section. **The American Midland Naturalist**, v. 27, p. 109–134, 1942.

ISAAC, A.; GUIDELLI, G. M.; DE FRANÇA, J. G.; PAVANELLI, G. C. Composição e estrutura das infracomunidades endoparasitárias de *Gymnotus* spp. (Pisces: Gymnotidae) do rio Baía, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 453–462, 2004.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1160–1166, 2019.

KUMAR, S.; STECHER G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger dataset. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870–1874, 2016.

KURAKU, S.; ZMASEK, C. M.; NISHIMURA, O.; KATOH, K. aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. **Nucleic Acids Research**, v. 41, W22–W28, 2013.

LANE, B.; SPIER, T.; WIEDERHOLT, J.; MEAGHER, S. Host specificity of a parasitic fluke: is *Posthodiplostomum minimum* a centrarchid-infecting generalist or specialist? **The Journal of Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 6–17, 2015.

LITTLEWOOD, D. T. J.; BRAY, R. A.; WAESCHENBACH, A. Phylogenetic patterns of diversity in cestodes and trematodes. In: MORAND, S.; KRASNOV, B. R.; LITTLEWOOD, D. T. J. (Eds.) **Parasite diversity and diversification: Evolutionary ecology meets phylogenetics**, 2015, cap. 16, p. 304–319.

LITTLEWOOD, D. T. J.; CURINI-GALLETTI, M.; HERNIOU, E. A. The interrelationships of *Proseriata* (Platyhelminthes: Seriata) tested with molecules and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 16, p. 449–466, 2000.

LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. Ecological aspects of metazoan parasites of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Characidae) of the upper Paraná River floodplain, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 4, p. 527–533, 2008.

LOCKE, S. A.; MCLAUGHLIN, J. D.; DAYANANDAN, S.; MARCOGLIESE, D. J. Diversity and specificity in *Diplostomum* spp. metacercariae in freshwater fishes revealed by *cytochrome c oxidase I* and internal transcribed spacer sequences. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 3, p. 333–343, 2010a.

LOCKE, S. A.; MCLAUGHLIN, J. D.; MARCOGLIESE, D. J. DNA barcodes show cryptic diversity and a potential physiological basis for host specificity among Diplostomoidea (Platyhelminthes: Digenea) parasitizing freshwater fishes in the St. Lawrence River, Canada. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 2813–2827, 2010b.

LOCKE, S. A.; MCLAUGHLIN, J. D.; LAPIERRE, A. R.; JOHNSON, P. T. J.; MARCOGLIESE, D. J. Linking larvae and adults of *Apharyngostrigea cornu*, *Hysteromorpha triloba* and *Alaria mustelae* (Diplostomoidea: Digenea) using molecular data. **Journal of Parasitology**, v. 97, p. 846–851, 2011.

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

LOCKYER, A. E.; OLSON, P. D.; LITTLEWOOD, D. T. J. Utility of complete large and small subunit rRNA genes in resolving the phylogeny of the Neodermata (Platyhelminthes): implications and a review of the cercomer theory. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 78, p. 155–171, 2003.

LOMBARDERO, O. J.; MORIENA, A. Nuevos trematodos para la Argentina en *Phrynos hilarii* (Dumeril & Briçon). **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 58, n.1, p. 64–68, 1977.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; LOCKE, S. A.; DE MELO, A. L.; RABELO, É. M. L.; PINTO, H. A. Molecular, morphological and experimental assessment of the life cycle of *Posthodiplostomum nanum* Dubois, 1937 (Trematoda: Diplostomidae) from Brazil, with phylogenetic evidence of the paraphyly of the genus *Posthodiplostomum* Dubois, 1936. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 63, p. 95–103, 2018.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; LOCKE, S. A.; DE ASSIS, J. C. A.; DRAGO, F. B.; DE MELO, A. L.; RABELO, É. M. L.; PINTO, H. A. Molecular, morphological and experimental-infection studies of cercariae of five species in the superfamily Diplostomoidea (Trematoda: Digenea) infecting *Biomphalaria straminea* (Mollusca: Planorbidae) in Brasil. **Acta Tropica**, v. 199, p. 105082, 2019.

LÓPEZ-JIMÉNEZ, A.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; GARCÍA-VARELA, M. Molecular data reveal high diversity of *Uvulifer* (Trematoda: Diplostomidae) in Middle America, with the description of a new species. **Journal of Helminthology**, v. 92, n. 6, p. 725–739, 2017.

LUNASCHI, L. I.; DRAGO, F. B. Digéneos parásitos de seis especies de aves de la provincia de Formosa, Argentina. **Revista mexicana de biodiversidad**, v. 80, n. 1, p. 39–46, 2009.

LUNASCHI, L. I.; DRAGO, F. B. Platyhelminthes, Trematoda, Digenea Carus, 1863: distribution extension in Argentina and new Anura and Ophidia hosts. **Check List**, 6, 447–450, 2010.

LUNASCHI, L. I.; SUTTON, C. A. Trematodes de reptiles incorporados a la Coleccion Helminologica del Museo de La Plata. **Neotropica**, v. 31, n. 85 p. 69–81, 1985.

LUNASCHI, L. I.; SUTTON, C.A. Presencia de *Paradiplostomum abbreviatum* (Brandes, 1888) (Digenea, Proterodiplostomidae) em *Caiman latirostris* (Daud.) em Argentina. **Neotropica**, v. 36, p. 123–127, 1990.

LUNDBERG, J. G.; KOTTELAT, M.; SMITH, G. R.; STIASSNY, M. L. J.; GILL, A. C. So many fishes, so little time: An overview of recent ichthyological discovery in continental waters. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 87, n. 1, p. 26–62, 2000.

MAÑÉ-GARZÓN, F.; ALONSO, A. Descripcion de la metacercaria de *Heterodiplostomum lanceolatum* Dubois 1936 (Digenea Strigeoidea), parasita de *Leptodactylus ocellatus* (L.). **Revista de Biología del Uruguay**, v. 7, p. 1–5, 1979.

MASCARENHAS, C. S.; BERNARDON, F. F.; MÜLLER, G. Intestinal digeneans of freshwater turtles *Phrynops hilarii* and *Acanthochelys spixii* (Testudines: Chelidae) from southern Brasil. **Revista Mexicana de Biodiversidade**, v. 87, p. 35–41, 2016.

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

MILLER, M. A., PFEIFFER, W., SCHWARTZ, T., Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, L.A.**, p. 1–8, 2010.

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

MOEMA, E. B.; KING, P. H.; RAKGOLE, J. N. Phylogenetic studies of larval digenean trematodes from freshwater snails and fish species in the proximity of Tshwane metropolitan, South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 86, n. 1, p. 1–7, 2019.

MOREIRA, S. T.; ITO, K. F.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. Ecological aspects of the parasites of *Iheringichthys labrosus* (Lütken, 1874) (Siluriformes: Pimelodidae) in reservoirs of Paraná basin and upper Paraná floodplain, Brazil. **Acta Sci Biol Sci**, v. 27, n. 4, p. 317–322, 2005.

MOSZCZYNSKA, A.; LOCKE, S. A.; MCLAUGHLIN, J. D.; MARCOGLIESE, D. J.; CREASE, T. J. Development of primers for the mitochondrial cytochrome *c* oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 75–82, 2009.

NASIR, P.; DIAZ, M. T. Fluker from Venezuelan reptiles with observations on intraspecific variations. **Rivista di Parassitologia**. v. 32, p. 233–248, 1971.



NASIR, P.; RODRIGUEZ, M. L. *Proterodiplostomum intermedium* n. sp. (Trematoda: Digenea) from the Crocodile *Caiman crocodilus crocodilus* (L.) in Venezuela. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 34, p. 144–146, 1967.

NGUYEN, T. C.; LI, Y. C.; MAKOULOUTOU, P.; JIMENEZ, L. A.; SATO, H. *Posthodiplostomum* sp. metacercariae in the trunk muscle of Northern snakeheads (*Channa argus*) from the Fushinogawa River, Yamaguchi, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 10, p. 1367–1372, 2012.

NIEWIADOMSKA, K. Some aspects of the biology and evolution of Strigeata La Rue and their importance in systematics of this group of Trematoda. **Acta Parasitology**, v. 21, p. 21–62, 1973.

NIEWIADOMSKA, K. Superfamily Diplostomoidea Poirier, 1886. In: GIBSON, D.I.; JONES, A.; BRAY, R.A. (Eds.), **Keys to the Trematoda**. CAB International and the Natural History Museum, Oxon, UK, p. 159–166. 2002a.

NIEWIADOMSKA, K. Family Diplostomidae Poirier, 1886. In: GIBSON, D.I.; JONES, A.; BRAY, R.A. (Eds.), **Keys to the Trematoda**. CAB International and the Natural History Museum, Oxon, UK, p. 167–196. 2002b.

NIEWIADOMSKA, K. Family Proterodiplostomidae Dubois, 1936. In: GIBSON, D.I.; JONES, A.; BRAY, R.A. (Eds.), **Keys to the Trematoda**, CAB International and the Natural History Museum, Oxon, UK, p. 215–229. 2002c.

NORONHA, D.; SÁ, M. R.; KNOFF, M.; MUNIZ-PEREIRA, L. C.; PINTO, R. M. **Adolfo Lutz e a Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz**. Museu Nacional, Rio de Janeiro. 2009. 154 p.

ODENING, K. The life-cycles of the trematodes *Neodiplostomum spathoides* Dubois and *N. attenuation* (v. Linstow) in the area of Berlin. **Monatsberichte der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin**, v. 7, n. 12, p. 952–954, 1965.

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

ONDRAČKOVÁ, M.; SIMKOVA, A.; GELNAR, M.; JURAJDA, P. *Posthodiplostomum cuticola* (Digenea: Diplostomatidae) in intermediate fish hosts: factors contributing to the parasite infection and prey selection by the definitive bird host. **Parasitology**, v. 129, n. 6, p. 761–770, 2004.

OSTROWSKI DE NÚÑEZ, M. Sobre el ciclo biológico de *Posthodiplostomum nanum* Dubois, 1937 (Trematoda, Diplostomatidae). **Physis**, v. 32, p. 121–132, 1973.

OVERSTREET, R. M.; COOK, J. O.; HEARD, R. W. Trematoda (Platyhelminthes) of the Gulf of Mexico, p. 419–486. In: FELDER, D. L.; CAMP, D. K. (Eds.) **Gulf of Mexico—Origins, Waters, and Biota. Vol: Biodiversity**. Texas: Texas A&M University Press, College Station, p. 419–486, 2009.

OVERSTREET, R. M.; CURRAN, S. S.; POTE, L. M.; KING, D. T.; BLEND, C. K.; GRATER, W. D. *Bolbophorus damnificus* n. sp. (Digenea: Bolbophoridae) from the channel catfish *Ictalurus punctatus* and American white pelican *Pelecanus erythrorhynchos* in the USA based on life-cycle and molecular data. **Systematic Parasitology**, v. 52, n. 2, p. 81–96, 2002.

OVERSTREET, R. M.; CURRAN, S. S. Defeating diplostomoid dangers in USA catfish aquaculture. **Folia Parasitologica**, v. 51, p. 153–165, 2004.

PALUMBO, E.; DIAZ, J. I. New species and new record of the genus *Cheloniodiplostomum* (Trematoda, Proterodiplostomidae, Polycotylineae), parasites of freshwater turtles from Argentina. **Parasitology Research**, v. 117, n. 3, p. 767–773, 2018.

PATTERSON, B. D. Accumulating knowledge on the dimensions of biodiversity: systematic perspectives on Neotropical mammals. **Biodiversity Letter**, v. 2, p. 79–86, 1994.

PEARSON, J. C. Observations on the morphology and life cycle of *Strigea elegans* Chandler & Rausch, 1947 (Trematoda: Strigeidae). **The Journal of Parasitology**, v. 45, n. 2, p. 155–174, 1959.

PEARSON, J. C. A phylogeny of life-cycle patterns of the Digenea. **Advances in parasitology**, v. 10, p. 153–189, 1972.

PELEGRIN, L. S.; GIÃO, T.; VIEIRA, D. H. M. D.; MÜLLER, M. I.; SILVA, R. J. S.; PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; AZEVEDO, R. K.; ABDALLAH, V. D. Molecular and morphological characterization of the metacercariae of two species of diplostomid trematodes (Platyhelminthes, Digenea) in freshwater fishes of the Batalha River, Brasil. **Parasitology research**, v. 118, n. 7, p. 2169–2182, 2019.

PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; GARCÍA-PRIETO, L.; MENDOZA-GARFIAS, B. Trematode parasites (Platyhelminthes) of wildlife vertebrates in Mexico. **Zootaxa**, v. 1534, n.1, p. 1–250, 2007.

PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G.; HERNÁNDEZ-MENA, D. I. Testing the higherlevel phylogenetic classification of Digenea (Platyhelminthes, Trematoda) based on nuclear rDNA sequences before entering the age of the ‘next-generation’ Tree of Life. **Journal of Helminthology**, v. 93, p. 260–276, 2019.

PINHEIRO, R. H. S.; TAVARES-DIAS, M.; GIESE, E. G. Helminth parasites in two populations of *Astronotus ocellatus* (Cichliformes: Cichlidae) from the eastern Amazon, Northern Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 3, p. 425–431, 2019.

PINTO, H. A.; MELO, A. L. Infecção natural de *Poecilia reticulata* (Actinopterygii: Poeciliidae) por metacercárias na represa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 38, n. 3, p. 257–264, 2012a.

PINTO, H. A.; MATI, V. L. T.; MELO, A. L. New hosts and localities for trematodes of snakes (Reptilia: Squamata) from Minas Gerais State, Southeastern Brasil. **Comparative Parasitology**, v. 79, p. 238–246, 2012b.

PINTO, H. A.; MATI, V. L. T.; DE MELO, A. L. New records and a checklist of trematodes from *Butorides striata* (Aves: Ardeidae). **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v. 84, n. 4, p. 1100–1110, 2013.

POULIN, R.; CRIBB, T. H. Trematode life cycles: short is sweet? **Trends in parasitology**, v. 18, n. 4, p. 176–183, 2002.

POUMARAU, E. M. C. Trematodes de ofidios de la Argentina. **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales**, v. 1, p. 1–129, 1968.

QUEIROZ, M. S., LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D., LOCKE, S. A., PINTO, H. A., ANJOS, L. A., Metacercariae of *Heterodiplostomum lanceolatum* (Trematoda: Proterodiplostomidae) found in *Leptodactylus podicipinus* (Anura: Leptodactylidae) from Brasil: a morphological, molecular and ecological study. **Journal of Helminthology**, v. 94, p. 1–8, 2019.

QUIST, M. C.; BOWER, M. R.; HUBERT, W. A. Infection by a black spot-causing species of *Uvulifer* and associated opercular alterations in fishes from a high-desert stream in Wyoming. **Diseases of aquatic organisms**, v. 78, n. 2, p. 129–136, 2007.

RAMBAUT, A. **FigTree** v. 1.4.2. 2012. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>> Acesso em: 26 de Março de 2019.

RITOSSA, L.; FLORES, V.; VIOZZI, G. Life-cycle stages of a *Posthodiplostomum* species (Digenea: Diplostomidae) from Patagonia, Argentina. **The Journal of Parasitology**, v. 99, n. 5, p. 777–780, 2013.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HOHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539–542, 2012.

RUIZ, J. M.; RANGEL, J. M. Estrigêidas de répteis brasileiros. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 26, p. 257–278, 1954.

SALGADO-MALDONADO, G.; CABAÑAS-CARRANZA, G.; SOTO-GALERA, E.; CASPETA-MANDUJANO, J. M.; MORENO-NAVARRETE, R. G.; SÁNCHEZ-NAVA, P.; AGUILAR-AGUILAR, R., 2001. A checklist of helminth parasites of freshwater fishes from the Lerma-Santiago River basin, Mexico. **Comparative Parasitology**, v. 68, p. 204–218, 2001.

SALGADO-MALDONADO, G.; CABAÑAS-CARRANZA, G.; SOTO-GALERA, E.; PINEDA-LÓPEZ, R. F.; CASPETA-MANDUJANO, J. M.; AGUILAR-CASTELLANOS, E.; MERCADO-SILVA, N. Helminth parasites of freshwater fishes of the Pánuco river basin, east central Mexico. **Comparative Parasitology**, v. 71, n. 2, p. 190–202, 2004.

SALGADO-MALDONADO, G.; AGUILAR-AGUILAR, R.; CABANAS-CARRANZA, G.; SOTO-GALERA, E.; MENDOZA-PALMERO, C. Helminth parasites in freshwater fish from the Papaloapan river basin, Mexico. **Parasitology Research**, v. 96, n. 2, p. 69–89, 2005.

SALGADO-MALDONADO, G.; NOVELO-TURCOTTE, M. T.; VAZQUEZ, G.; CASPETA-MANDUJANO, J. M.; QUIROZ-MARTINEZ, B.; FAVILA, M. The communities of helminth parasites of *Heterandria bimaculata* (Teleostei: Poeciliidae) from the upper Río La Antigua basin, east-central Mexico show a predictable structure. **Parasitology**, v. 141, n. 7, p. 970–980, 2014.

SANTOS, P. H. N.; TAVARES-DIAS, M. First study on communities of parasites in *Triportheus rotundatus*, a Characidae fish from the Amazon River system (Brasil). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 28–33, 2017.

SCHOLZ, T.; VARGAS-VÁZQUEZ, J.; MORAVEC, F.; VIVAS-RODRÍGUEZ, C.; MENDOZA-FRANCO, E. Metacercariae of trematodes of fishes from cenotes (= sinkholes) of the Yucatan Peninsula, Mexico. **Folia Parasitologica**, v. 42, n. 3, p. 173–192, 1995.

SELBACH, C.; SOLDÁNOVÁ, M.; GEORGIEVA, S.; KOSTADINOVA, A.; SURES, B. Integrative taxonomic approach to the cryptic diversity of *Diplostomum* spp. in lymnaeid snails from Europe with a focus on the '*Diplostomum mergi*' species complex. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 300, 2015.

SHAAF, C. J.; KELSON, S. J.; NUSSLÉ, S. C.; CARLSON, S. M. Black spot infection in juvenile steelhead trout increases with stream temperature in northern California. **Environmental biology of fishes**, v. 100, n. 6, p. 733–744, 2017.

SHOOP, W. L. Systematic analysis of the Diplostomidae and Strigeidae (Trematoda). **Journal of Parasitology**, v. 75, p. 21–32, 1989.

SKRJABIN, K. I. **Trematodes of Animals and Man**. Academy of Science of the USSR. Moscow. v. 18, 1960. 746 p. (In Russian).

SOLDÁNOVÁ, M.; GEORGIEVA, S.; ROHÁČOVÁ, J.; KNUDSEN, R.; KUHN, J. A.; HENRIKSEN, E. H.; SIWERTSSON, A.; SHAW, J. C.; KURIS, A. M.; AMUNDSEN, P.; SCHOLZ, T.; LAFFERTY, K. D.; KOSTADINOVA, A. Molecular analyses reveal high species diversity of trematodes in a sub-Arctic lake. **International journal for parasitology**, v. 47, n. 6, p. 327–345, 2017.

STOYANOV, B.; GEORGIEVA, S.; PANKOV, P.; KUDLAI, O.; KOSTADINOVA, A.; GEORGIEV, B. B. Morphology and molecules reveal the alien *Posthodiplostomum centrarchi* Hoffman, 1958 as the third species of *Posthodiplostomum* Dubois, 1936 (Digenea: Diplostomidae) in Europe. **Systematic Parasitology**, v. 94, n. 1, p. 1–20, 2017.

SUBAIR, K. T.; BRINESH, R.; JANARDANAN, K. P. Studies on the life-cycle of *Uvulifer iruvettiensis* sp. nov. (digenea: diplostomidae). **Acta parasitologica**, v. 58, n. 1, p. 91–97, 2013.

SUDARIKOV, V. E. **Order Strigeidida (La Rue, 1926) Part 1. Morphological characteristics of strigeids and superfamily Strigeoidea Railliet, 1919**. In: SKRJABIN, K.I. (Ed.), *Trematodes of Animals and Man. Principles of Trematodology*, 1959, p. 217–631.

SZIDAT, L. Structure, development, and behaviour of new strigeatoid metacercariae from subtropical fishes of South America. **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 26, n. 4, p. 753–786, 1969.

TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C.; LIZAMA, M. A. P.; LACERDA, A. C. F.; YAMADA, F. H.; MOREIRA, L. H. A.; CESCHINI, T. L.; BELLAY, S. Diversity of parasites of fish from the Upper Paraná River floodplain, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 691–705, 2009.

TAVARES-DIAS, M.; NEVES, L. R.; FERNANDES, B. M. M. First report of metacercariae (Digenea) infecting *Astronotus ocellatus* (Cichliformes: Cichlidae) from the Amazon Region, Brasil. **Embrapa Amapá-Neotropical Helminthology**, v. 5, n. 2, p. 235–240, 2011.

TAVARES-DIAS, M.; SOUSA, T. J. S. M.; NEVES, L. R. Parasitic infections in two Benthopelagic fish from Amazon: the Arowana *Osteoglossum bicirrhosum* (Osteoglossidae) and Oscar *Astronotus ocellatus* (Cichlidae). **Bioscience Journal**, v. 30, n. 2, p. 546–555, 2014

TELLEZ, M. **A checklist of host-parasite interactions of the order crocodylia**. v. 136. University of California Press, 2013. 376 p.

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

TKACH, V. V.; LITTLEWOOD, D. T. J.; OLSON, P. D.; KINSELLA, J. M.; SWIDERSKI, Z. Molecular phylogenetic analysis of the Microphalloidea Ward, 1901 (Trematoda: Digenea). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 1, p. 1–15, 2003.

TRAVASSOS, L.; FREITAS, J. T. D.; KOHN, A. **Trematódeos do Brasil**. v. 67. Rio de Janeiro: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, p. 1–886, 1969. 886 p.

VAN STEENKISTE, N.; LOCKE, S. A.; CASTELIN, M.; MARCOGLIESE, D. J.; ABBOTT, C. L. New primers for DNA barcoding of digeneans and cestodes (Platyhelminthes). **Molecular Ecology Resources**, v.15, n. 4, p. 945–952, 2015.

VANHOVE, M. P. M.; TESSENS, B.; SCHOELINCK, C.; JONDELIUS, U.; LITTLEWOOD, D. T. J.; ARTOIS, T.; HUYSE, T. Problematic barcoding in flatworms: A case-study on monogeneans and rhabdocoels (Platyhelminthes). **Zookeys**, n. 365, p. 355–379, 2013.

VIANA, L. Tentativa de catalogação das espécies brasileiras de trematódeos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 17, n. 1, p. 95–227, 1924.

YAMAGUTI, S. *Systema helminthum*. Volume I. The digenetic trematodes of vertebrates. Part 1. **Interscience Publishers**, New York. 1958. 978 p.

YAMAGUTI, S. **Synopsis of digenetic trematodes of vertebrates**. v. 1. Tokyo: Keigaku, 1971. 1074 p.

WOO, P. T. K.; LEATHERLAND, J. F.; BRUNO, D. W. **Fish diseases and disorders**. CABI, 2006.

ZRNČIĆ, S.; ORAIĆ, D.; MIHALJEVIĆ, Ž.; ČALETA, M.; ZANELLA, D.; JELIĆ, D.; JELIĆ, M. First observation of *Posthodiplostomum cuticola* (Nordmann, 1832) metacercariae in cypriniformes from Croatia. **Helminthologia**, v. 46, n. 2, p. 112–116, 2009.